

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Tissue Engineering für seltene Erkrankungen mit Störungen des mukoziliären Transports

Tissue engineering for rare diseases with impaired mucociliary transport

vorgelegt von

Nina Theresa Lodes

geboren in

Nürnberg

angefertigt am

Universitätsklinikum Würzburg - Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin

Würzburg 2019

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r:

1. Betreuerin: Dr. Maria Steinke

2. Betreuer: Prof. Dr. Helge Hebestreit

3. Betreuer: PD Dr. Stephan Hackenberg

4. Betreuer: Prof. Dr. Roy Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

I don't believe that anybody
feels the way I do, about you now
(Wonderwall – Oasis)

Abstract

Cystic fibrosis (CF) and primary ciliary dyskinesia (PCD) are two rare diseases which, among others, impair the mucociliary transport. CF is one of the most common inherited metabolic diseases with patients suffering from a defect in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductor Regulator* (CFTR) gene, which is characterized by the production of highly viscous secretions in mucin-producing organs such as the gastrointestinal tract and lungs. Patients suffering from PCD have defects in currently approximately 38 known and PCD-associated genes resulting in structural defects of the ciliary apparatus and thus in dysfunctional cilia. Since neither CF nor PCD have any chance of being cured so far, the main focus is on alleviating the symptoms. The basic goal is the long-term preservation of lung function and the prevention of microbial infections. Previous model systems for exploring possible therapeutic options have been animal models that can never completely represent the human phenotype due to species diversity. Human intestinal organoid cultures are considered as a promising test system for cystic fibrosis. However, since respiratory symptoms are mainly responsible for patient mortality, CF respiratory models provide better test systems for future therapeutics. Respiratory organoid cultures have been used to study CFTR functionality, but do not completely represent the *in vivo* situation. In order to develop new therapeutic strategies, patient-specific 3D *in vitro* test systems for the human respiratory tract expressing functional kinocilia are required, which can be used in particular with regard to personalized medicine.

In the present thesis, a new method for obtaining cells from nasal mucosal brush biopsies was established, that guarantees a standardised supply of human primary material. In order to generate a disease-specific cell line, such as a PCD cell line, using the CRISPR/Cas9 system, a respiratory cell line that fully represents the *in vivo* situation is required. Hence, four different respiratory epithelial cell lines (HBEC3-KT, Calu-3, VA10 and Cl-huAEC) were investigated with regard to their mucociliary phenotype, whereby only the cell line HBEC3-KT differentiated into ciliated cells. However, these showed kinocilia only on approx. 5 % of the model's surface, thus the human respiratory mucosa could not be completely modelled and HBEC3-KT cell line is no suitable cell line for gene editing experiments.

Tissue engineering made it possible to build 3D *in vitro* test systems based on two different matrices, the biological SIS (*small intestine submucosa*) and synthetic PET (polyethylene terephthalate) membranes. 3D airway test systems were generated using human primary nasal and tracheobronchial epithelial cells. In addition to histological investigations and

the characterization of specific markers of the respiratory system by immunofluorescence, the ultrastructure of the models was analyzed with a special focus on ciliary structures. In order to gain insight into the ciliary functionality and thus to achieve a high *in vivo* correlation, the method of high-speed video microscopy was established within the scope of this work at the Chair of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, which allows the analysis of ciliary beat frequency as well as mucociliary transport. The influence of isotonic saline solution and salbutamol, a β 2-adrenergic agonist mainly used as bronchodilator in asthma patients, on ciliary beat frequency was also analyzed. It could be shown that both substances increased the ciliary beat of the primary respiratory mucosa models. In order to generate test systems for the two rare diseases CF and PCD, epithelial cells of the affected patients were first examined by non-invasive Raman spectroscopy for a potential biomarker that could be used in diagnostic approaches. However, no biomarker for CF or PCD could be detected, with PCD cells showing a low separation to non-PCD cells. Subsequently, 3D test systems based on patient cells were developed. The phenotype of the CF models was verified by immunohistological staining and analysis of impaired mucociliary transport. Ultrastructural ciliary defects could be identified by ultrastructural analysis of cilia cross sections in three donor-specific PCD models. Additionally, ciliary functionality could not be detected using high speed video microscopy analysis. In summary, this work succeeded in establishing a new method for the complete characterization of 3D airway test systems, which allows the analysis of ciliary beating frequency and mucociliary transport. It has been shown for the first time that tissue engineering can be used to generate a personalized disease model for PCD using a decellularized porcine jejunum as a scaffold. Both, PCD and CF disease models could in future be regarded as test systems for potential therapeutics.

Zusammenfassung

Bei der zystischen Fibrose (CF) sowie der primären Ziliendyskinesie (PCD) handelt es sich um zwei seltene Erkrankungen, die unter anderem den mukoziliären Transport beeinträchtigen. CF gehört hierbei zu den am häufigsten vorkommenden angeborenen Stoffwechselerkrankungen, wobei Betroffene unter einem Defekt des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductor Regulator* (CFTR)-Gens leiden, der durch die Produktion von hochviskosem Sekret in mizinproduzierenden Organen, wie dem gastrointestinalen Trakt und der Lunge, gekennzeichnet ist. Patienten, die an PCD leiden, weisen Defekte in, zum jetzigen Zeitpunkt, ca. 38 bekannten und PCD-assoziierten Genen auf, die in strukturellen Defekten des ziliären Apparats und somit in dysfunktionalen Kinozilien resultieren. Da aktuell weder für die CF noch für die PCD eine Heilung möglich ist, steht bei der Therapie vor allem die Linderung der Symptome im Fokus. Grundlegendes Ziel ist der langfristige Erhalt der Lungenfunktion sowie die Prävention bakterieller Infekte. Als bisherige Modellsysteme zur Erforschung möglicher Therapeutika gelten Tiermodelle, die den humanen Phänotyp aufgrund von Speziesdiversität nicht vollständig abbilden können. Als vielversprechende Testsysteme für die zystische Fibrose gelten humane intestinale Organoidkulturen. Nachdem allerdings vorwiegend respiratorische Symptome für die Mortalität der Patienten verantwortlich sind, stellen CF-Atemwegsmodelle bessere Testsysteme für zukünftige Therapeutika dar. Atmungsorganoidkulturen wurden verwendet, um die CFTR-Funktionalität zu untersuchen, repräsentieren aber nicht vollständig die *in vivo* Situation. Deshalb werden zur Entwicklung neuer Therapiestrategien patientenspezifische 3D *in vitro* Testsysteme der humanen Atemwege benötigt, die insbesondere im Hinblick auf personalisierte Medizin ihren Einsatz finden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine für den Lehrstuhl neue Methode zur Zellgewinnung aus nasalen Schleimhautabstrichen etabliert, die eine standardisierte Versorgung mit humanem Primärmaterial garantiert. Zur Generierung einer krankheitsspezifischen Zelllinie, wie beispielsweise einer PCD-Zelllinie mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems, ist eine Atemwegszelllinie erforderlich, die die *in vivo* Situation vollständig repräsentiert. So wurden vier verschiedene respiratorische Epithelzelllinien (HBEC3-KT, Calu-3, VA10 und Cl-huAEC) auf ihren mukoziliären Phänotyp hin untersucht, wobei lediglich die Zelllinie HBEC3-KT in zilienträgende Zellen differenzierte. Diese zeigten jedoch nur auf ca. 5 % der Modelloberfläche Kinozilien, wodurch die humane respiratorische Mukosa nicht komplett abgebildet werden konnte und die HBEC3-KT-Zelllinie keine geeignete Zelllinie zur Generierung einer PCD-Zelllinie darstellte.

Mit Hilfe des *Tissue Engineering* war es möglich, 3D *in vitro* Testsysteme basierend auf

zwei unterschiedlichen Matrices, der biologischen SIS (*small intestinal submucosa*) und der synthetischen Polyethylenterephthalat (PET)-Membran, aufzubauen. Es wurden 3D-Atemwegstestsysteme mit humanen primären nasalen und tracheobronchialen Epithelzellen generiert. Ergänzend zu histologischen Untersuchungen und zur Charakterisierung spezifischer Marker des respiratorischen Systems mittels Immunfluoreszenz, wurde die Ultrastruktur der Modelle, mit speziellem Fokus auf ziliäre Strukturen, analysiert. Um Rückschlüsse auf die ziliäre Funktionalität ziehen zu können und somit eine hohe *in vivo* Korrelation zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin die Methode der Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie etabliert, welche die Analyse der Zilienschlagfrequenz sowie des mukoziliären Transports ermöglicht. Ebenfalls wurde der Einfluss von isotoner Kochsalzlösung und des β 2-adrenergen Agonisten Salbutamol, das vor allem als Bronchodilatator bei Asthmapatienten eingesetzt wird, auf die Zilienschlagfrequenz analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Substanzen den Zilienschlag im Atemwegsmodell erhöhen.

Zur Generierung der Testsysteme der beiden seltenen Erkrankungen CF und PCD wurden Epithelzellen der betroffenen Patienten zunächst mittels nicht-invasiver Raman-Spektroskopie auf einen potentiellen Biomarker untersucht, welcher Einsatz in der Diagnostik der beiden Krankheiten finden könnte. Es konnte jedoch weder für die CF noch für die PCD ein Biomarker aufgedeckt werden. Jedoch zeigten PCD-Zellen eine geringe Auftrennung gegenüber nicht-PCD Zellen. Anschließend wurden 3D-Atemwegstestsysteme basierend auf Patientenzellen aufgebaut. Der Phänotyp der CF-Modelle wurde mittels immunhistologischer Färbung und der Analyse des gestörten mukoziliären Transports verifiziert. Strukturelle ziliäre Defekte konnten durch die ultrastrukturelle Analyse von Zilienquerschnitten in drei donorspezifischen PCD-Modellen identifiziert werden. Darüber hinaus konnte die ziliäre Funktionalität mit Hilfe der Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen, eine neue Methode zur vollständigen Charakterisierung von 3D-Atemwegstestsystemen zu etablieren, die die Analyse der Zilienschlagfrequenz sowie des mukoziliären Transports ermöglicht. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass mit Hilfe des *Tissue Engineering* ein personalisiertes Krankheitsmodell für die PCD auf Segmenten eines dezellularisierten porzinen Jejunums generiert werden kann, das zukünftig ein Testsystem für potentielle Therapeutika darstellen kann.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	III
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Das humane respiratorische System	1
1.2 Seltene Erkrankungen mit Störungen des mukoziliären Transports	4
1.2.1 Zystische Fibrose	5
1.2.2 Primäre Ziliendyskinesie	8
1.3 Personalisierte Medizin im Hinblick auf die seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie	11
1.4 Tissue Engineering	14
1.5 Modellorganismen und Testsysteme für die seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie	16
2 Zielsetzung	19
3 Material	20
3.1 Biologisches Material	20
3.2 Antikörper	21
3.3 Chemikalien	22
3.4 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur	23
3.5 Puffer und Lösungen	23
3.6 Verbrauchs- und Labormaterialien	24
3.7 Laborgeräte	26
3.8 Software	28
4 Methoden	29
4.1 Zellkulturtechniken	29
4.1.1 Kultivierung von Primärzellen und Zelllinien	29
4.1.2 Zellisolation aus humanen Gewebeproben der oberen Atemwege	29
4.1.3 Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen	30

4.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
4.1.5	Passagieren von Zellen	31
4.1.6	Determinierung der Zellzahl und Vitalitätsbestimmung	32
4.2	Herstellung der biologischen Matrix SISser	32
4.3	Aufbau und Kultivierung von 3D <i>in vitro</i> Atemwegstestsystemen	33
4.3.1	Aufbau von 3D-Atemwegstestsystemen	34
4.3.2	Kultivierung der Atemwegsmodelle MucilAir TM (Epithelix)	36
4.4	Substanzapplikation mittels Vitrocell [®] Cloud Aerosolgenerator	36
4.5	Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie	36
4.5.1	Zilienschlagfrequenzanalyse	37
4.5.2	Statistische Analyse	37
4.5.3	Analyse der mukoziliären Transportgeschwindigkeit	38
4.6	Histologische Charakterisierung und Immunfluoreszenzfärbung	38
4.6.1	Fixieren von Zellen und Gewebe	38
4.6.2	Paraffineinbettung und Mikrotomschnitte	38
4.6.3	Entparaffinieren und Rehydrieren	39
4.6.4	Hämatoxylin und Eosin Färbung	40
4.6.5	Immunfluoreszenzfärbung	41
4.7	Ultrastrukturelle Analyse	42
4.8	Raman-Spektroskopie und multivariate Datenanalyse	42
5	Ergebnisse	44
5.1	Aufbau und Charakterisierung von humanen 3D-Atemwegstestsystemen . .	44
5.1.1	Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen	44
5.1.2	Der epitheliale Charakter von respiratorischen Epithelzellen in 2D .	45
5.1.3	Histomorphologische Charakterisierung von Atemwegstestsystemen	45
5.1.4	Immunhistologische Untersuchung spezifischer Marker in Atemwegs- testsystemen	47
5.1.5	Ultrastrukturelle Analyse von Atemwegstestsystemen	49
5.2	Funktionale Analyse im humanen 3D-Atemwegstestsystem	50
5.2.1	Ziliäre Schlagfrequenz	50
5.2.2	Der Einfluss von isotonischer Kochsalzlösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz	54
5.2.3	Mukoziliärer Transport	56
5.3	Definierte Krankheitsmodelle	57
5.3.1	Zystische Fibrose	58
5.3.2	Primäre Ziliendyskinesie	61

5.4	Raman-Spektroskopie zur nicht-invasiven Analyse von Patientenzellen . . .	64
5.4.1	Zystische Fibrose	64
5.4.2	Primäre Ziliendyskinesie	65
6	Diskussion	68
6.1	Charakterisierung von 3D-Atemwegstestsystemen	69
6.2	Definierte Krankheitsmodelle	76
6.2.1	Zystische Fibrose	76
6.2.2	Primäre Ziliendyskinesie	78
6.3	Identifizierung eines Biomarkers mittels Raman-Spektroskopie für die seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie	79
7	Schlussfolgerung und Ausblick	82
	Literaturverzeichnis	84
	Danksagung	101
	Eidesstattliche Erklärung	104
	Publikationen	105
	Anhang	106

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht des biologischen und humanen Materials sowie der humanen Zelllinien	21
2	Übersicht der in der Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper . .	21
3	Übersicht der Chemikalien	22
4	Übersicht der Nährmedien für die Zellkultur	23
5	Übersicht der Puffer und Lösungen	23
6	Übersicht der Verbrauchsmaterialien	24
7	Übersicht der Labormaterialien	25
8	Übersicht der Laborgeräte	26
9	Übersicht der Software	28
10	Programm zur Paraffineinbettung	39
11	Protokoll zum Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte	40
12	Protokoll zur HE-Färbung	40
13	Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung	41
14	Konfusionsmatrix des PCA-LDA-Modells	67

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung der humanen Atemwege	2
2	Schematische Darstellung der axonemalen Struktur einer Zilie	3
3	Schematische Darstellung des CFTR-Ionenkanals im geschlossenen und geöffneten Zustand	5
4	Übersicht der aktuell bekannten PCD-assoziierten Mutationen	10
5	Bespannen einer Zellkrone mit der biologischen Matrix SIS	35
6	Epitheliale Zellcharakterisierung in 2D	45
7	HE-Färbung der 3D-Atemwegstestssysteme	46
8	Immunhistologische Charakterisierung der 3D-Atemwegstestssysteme	48
9	Ultrastrukturelle Analyse der 3D-Atemwegstestssysteme mittels TEM	49
10	<i>Heat maps</i> und Histogramme von HBEC3-KT-, hTEC- und hNEC-basierten 3D-Atemwegsmodellen	51
11	Quantitative Zilienschlagfrequenzanalyse von nasalen und tracheobronch- ialen 3D-Atemwegsmodellen basierend auf unterschiedlichen Matrices	52
12	Donorspezifische Zilienschlagfrequenzanalyse von nasalen und tracheobronch- ialen 3D-Atemwegsmodellen basierend unterschiedlichen Matrices	53
13	Einfluss von 0,9 % NaCl-Lösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz in nasalen und tracheobronchialen Atemwegsmodellen im zeitlichen Verlauf	55
14	Einfluss von 0,9 % NaCl-Lösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz in 3D-Atemwegsmodellen	56
15	Qualitative und quantitative Analyse des mukoziliären Transports in 3D- Atemwegstestssystemen basierend auf unterschiedlichen Matrices	57
16	HE- und Immunfluoreszenzfärbung sowie ultrastrukturelle Charakterisie- rung von CF-Modellen	58
17	Zilienschlagfrequenzanalyse der CF-Modelle	59
18	Qualitative und quantitative Analyse des mukoziliären Transports in CF- vs. nicht-CF-Atemwegstestssystemen	60
19	Immunhistologische Charakterisierung der PCD-Modelle	61
20	Histomorphologische Charakterisierung und ultrastrukturelle Analyse von PCD-Modellen und Zilienquerschnitten	63
21	Mittelwertspektren und Hauptkomponentenanalyse von respiratorischen Epi- thelzellen CF- und nicht-CF-Erkrankter	64
22	Mittelwertspektren, Hauptkomponentenanalyse und entsprechende <i>loadings</i> <i>plots</i> von respiratorischen Epithelzellen PCD- und nicht-PCD-Erkrankter	65

23	<i>Score plots</i> über relevante Bereiche der Auftrennung zwischen PCD und nicht-PCD Zellen	66
----	--	----

Abkürzungsverzeichnis

2D/3D	2/3 dimensional
ABC	engl. <i>ATP-binding cassette</i> (ATP-bindende Kasette)
AECG	engl. <i>airway epithelial cell growth medium</i> (Atemwegsepithelzell-Wachstumsmedium)
ATP	Adenosintriphosphat
BioVaSc	engl. <i>biological vascularized scaffold</i> (biologische vaskularisierte Matrix)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBF	Zilienschlagfrequenz
CF	zystische Fibrose
CFTR	engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductor regulator</i>
CK5/18	Cytokeratin 5/18
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	fetales Kälberserum
GUI	engl. <i>graphical user interface</i> (grafische Benutzeroberfläche)
HE	Hämatoxylin und Eosin
hiPSC	humane induziert pluripotente Stammzellen
hNEC	humane nasale Epithelzellen
HSVM	Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie
hTEC	humane tracheobronchiale Epithelzellen
K-SFM	engl. <i>defined keratinocyte-SFM</i>
LDA	lineare Diskriminantenanalyse
LTERM	Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
MEM	engl. <i>Minimum Essential Medium</i>
Muc5ac/Muc5b	Muzin 5ac/5b
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
N-DRC	Nexin-Dynein-Regulierungskomplex
ODA/IDA	äußerer bzw. innerer Dyneinarm
PCA	engl. <i>principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)

PCD	primäre Ziliendyskinesie
PCL	Periziliarschicht
PET	Polyethylenterephthalat
PTC	engl. <i>premature termination codon</i> (frühzeitiges Stopcodon)
R-Domäne	regulatorische Domäne
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rhDNase	rekombinante humane Desoxyribonuklease
ROI	engl. <i>region of interest</i> (interessierender Bereich)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SIS	engl. <i>small intestine submucosa</i> (Dünndarm-Submukosa)
SOP	engl. <i>standard operating procedure</i> (Standardarbeitsanweisung)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TJ	engl. <i>tight junctions</i> (Verschlusskontakte)
TMD	Transmembrandomäne
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

1 Einleitung

1.1 Das humane respiratorische System

Das humane respiratorische System lässt sich in die oberen und unteren Atemwege unterteilen. Zu den oberen Atemwegen gehören Nase, Nasennebenhöhlen, Rachenraum (*Pharynx*) und Kehlkopf (*Larynx*). Die darauffolgende Luftröhre (*Trachea*) teilt sich in Höhe des vierten Brustwirbels in die beiden Hauptbronchien (*Bronchus principales*), die in die linke und rechte Lunge eintreten. Der von den Hauptbronchien ausgehende Bronchialbaum (*Arbor bronchialis*) verzweigt sich stark innerhalb des Lungengewebes und mündet in die Lungenalveolen.

Innerhalb der Nase und des *Pharynx* findet die Reinigung, das Anwärmen und Anfeuchten der einströmenden Luft und erste Prozesse der Immunabwehr statt. Der *Larynx* schützt die unteren Atemwege durch seinen reflektorisch ausgelösten Verschluss vor Aspiration und ist außerdem für die Phonation zuständig. Die *Trachea* beginnt unterhalb des Ringknorpels des *Larynx* und endet mit ihrer Aufzweigung in den linken und rechten Haupttracheus (*Bronchus principalis*). Sie ist beim erwachsenen Menschen ca. 10- 15 cm lang und hat einen Durchmesser von 2 cm. Zu ihrer Stabilisation besteht die *Trachea* aus 15 bis 20 hufeisenförmigen Knorpelspannen, die nach hinten gerichtet sind. Diese sind über ein an elastischen Fasern reiches Bindegewebe verbunden und mit gleichem überzogen. In den unteren Atemwegen teilen sich die *Bronchus principalis* in Lappen-, Segment- und Subsegmentbronchien auf, bis das konduktive Atemwegssystem nach ca. 23 Aufteilungen mit den *Bronchioli terminales* endet und der Übergang in die gasaustauschenden *Bronchioli respiratorii* folgt, an welche sich die Lungenbläschen anschließen (siehe Abb. 1) [2, 3, 4]. Von der Nase bis zu den Hauptbronchien sind die Atemwege mit einem mehrreihigen (pseudostratifizierten) Flimmerepithel ausgekleidet, welches aus den zilienträgenden Zellen und schleimproduzierenden Becherzellen besteht, die beide am Selbstreinigungsmechanismus (Mukoziliäre Selbstreinigung) des respiratorischen Systems beteiligt sind. Die schleimproduzierenden Becherzellen sind stark polarisiert und ihr Kern ist auf die Zellbasis lokalisiert. Das Flimmerepithel ist mit einer 10 - 15 μm dicken Schleimschicht bedeckt, wobei sich der Mukus aus 1 % Muzinen, 1 % Salz, 1 % anderen Proteinen und 97 % Wasser zusammensetzt [5]. Die Schleimschicht kann in zwei Phasen unterteilt werden: Die niedrigviskose Periziliarschicht (PCL) und die darüber liegende viskoelastische Gelphase. Die wichtigsten Bestandteile des produzierten Schleims sind die Muzinglykoproteine, die in den Atemwegen exprimiert werden (z.B. Muc5ac und Muc5b) [1]. In gesunden Atemwegen exprimieren die Becherzellen typischerweise Muc5ac, während die Muc5b Expression

1 Einleitung

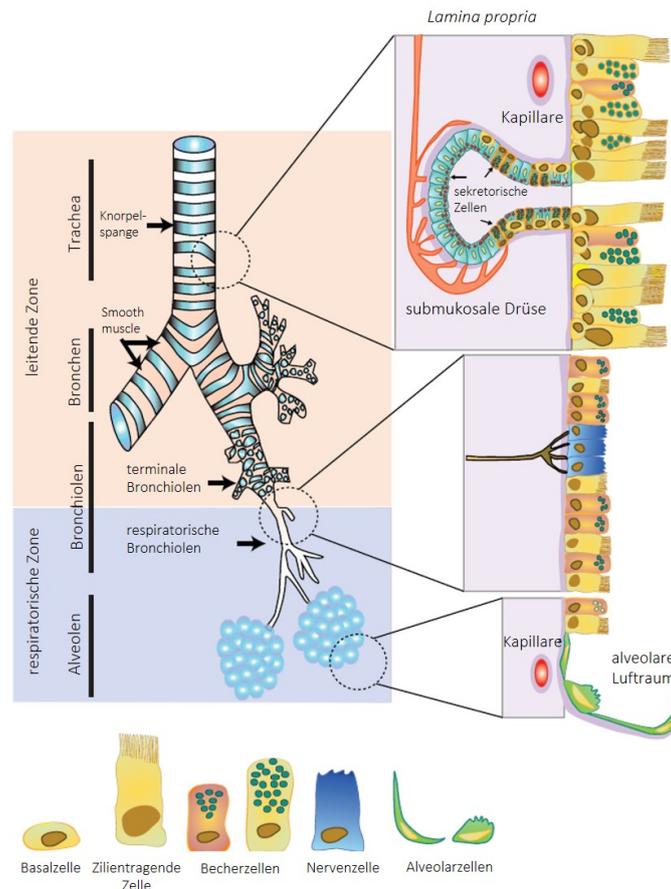


Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen Atemwege. Die Atemwege sind funktionell in die leitende und die respiratorische Zone untergliedert. Die *Trachea* teilt sich in den rechten und linken Hauptbronchus auf. Der darauffolgende Bronchus teilt sich in die Bronchiolen auf, die nach mehreren bronchiolaren Verzweigungen am Ende in die Alveolen übergehen. *Trachea* und proximale Atemwege sind von einem pseudostratifiziertem Epithel gesäumt, das aus Flimmer- und schleimproduzierenden Zellen besteht. Modifiziert nach *Bustamante-Marin und Ostrowksi, 2017* [1]. Abdruckgenehmigung liegt vor.

hauptsächlich auf Drüsenzellen beschränkt ist. Kleinere Fremdstoffe und Mikroorganismen können durch den Mukus gebunden werden und über den *Pharynx*-gerichteten Zilienschlag aus dem respiratorischen Trakt befördert werden [6, 7, 4, 3, 8]. Eine erhöhte Produktion und Sekretion von Muzinen ist ein Merkmal vieler chronischer Atemwegserkrankungen, beispielsweise der zystischen Fibrose [6].

Kinozilientragende Zellen sind final differenzierte Epithelzellen [9] und machen ca. 60 % der Zellen des Flimmerepithels aus [1]. In der apikalen Region besitzen sie viele Mitochondrien, um die Verfügbarkeit von Adenosintriphosphat (ATP) zur Aufrechterhaltung der

1 Einleitung

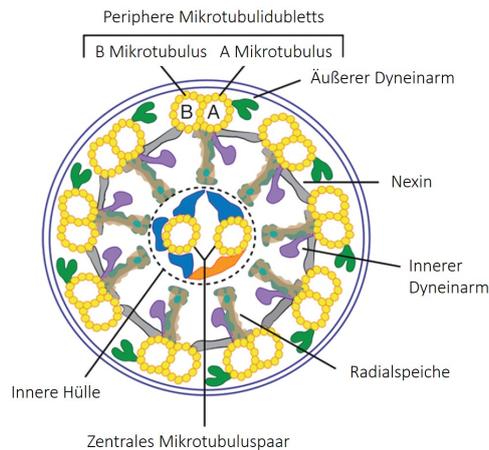


Abbildung 2: Schematische Darstellung der axonemalen Struktur einer Zilie. Der schematische Zilienquerschnitt zeigt die typische $9 \times 2 + 2$ Anordnung einer motilen Kinozilie, wobei neun periphere Mikrotubulidubletts ein zentrales Mikrotubuli-Paar umgeben. Zu den Proteinkomplexen gehören der Nexin-Dynein-Regulierungskomplex (N-DRC), radiale Speichen sowie innere und äußere Dyneinarme. Modifiziert nach *Bustamante-Marin und Ostrowski*, 2017 [1]. Abdruckgenehmigung liegt vor.

ziliären Motilität, die durch die motorische Aktivität von axonemalem Dynein vermittelt wird, sicherzustellen [10]. Die Kinozilien sind bewegliche zytoplasmatische Ausstülpungen respiratorischer Epithelzellen, die eine Länge von 4 - 6 μm aufweisen und deren Beweglichkeit Voraussetzung für einen effektiven mukoziliären Transport ist. Die hochkonservierte Mikrotubuli-basierte Struktur, auch Axonem genannt, zeigt eine $9 \times 2 + 2$ Anordnung (siehe Abbildung 2). Das zentrale Paar ist von neun peripheren Mikrotubulidubletts, die aus einem A- (13 Protofilamente) und einem B-Tubulus (10 - 11 Protofilamente) bestehen, umgeben [11]. Diese Dubletts sind durch den Nexin-Dynein-Regulierungskomplex (N-DRC) miteinander verbunden, der als zentraler Regulator der motorischen Aktivität gilt [12]. Die Radialspeichen, die einerseits für die mechanische Stabilität des Axonems und andererseits für die Regulation der ziliären Funktionalität verantwortlich sind, ragen von den peripheren Dubletts in Richtung des Zentralpaares [13, 1, 8]. Ein äußerer (ODA) und ein innerer Dyneinarm (IDA) ragen jeweils von jeder A-Untereinheit des peripheren Mikrotubulidubletts im Uhrzeigersinn in Richtung der B-Untereinheit des nächsten Paares [11]. Die ODA (bzw. IDA) bestehen aus zwei schweren Dyneinketten- (α und β , 470 - 540 kDa), zwei oder mehreren Intermediärketten- (57- 140 kDa) und vier bis acht leichten Dyneinketten-Proteinen (6 - 22 kDa) [14]. Diese Ketten verankern den Dyneinarm am A-Tubulus und sind an der Regulation des Zilienschlags beteiligt, wobei die ODA in erster Linie für die Regulation der Zilienschlagfrequenz (CBF) und die IDA für die

1 Einleitung

Biege- und Wellenform verantwortlich sind [15]. Bei axonemalen Dyneinen, die als Motor der ziliären Aktivität gelten, handelt es sich um ATPasen [11]. Die Freisetzung von ATP bewirkt das Verschieben der Mikrotubulidubletts gegeneinander, woraus der Zilienschlag resultiert [8].

Der Zyklus eines Zilienschlags besteht aus einem Wirk- und Rückschlag und einem anschließenden Ruhezustand, wobei die Zilien nahezu 180 Grad nach hinten schwenken. Während des Zilienschlags bilden Dyneinarme molekulare Brücken zwischen den A- und B-Untereinheiten benachbarter äußerer Mikrotubulidubletts und durchlaufen unter Verwendung von Energie aus der ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung, die dazu führt, dass Mikrotubuli relativ zueinander gleiten [11]. Jede Kinozilie schlägt mit der gleichen Frequenz, aber phasenverschoben zu ihrem Nachbarn entlang der Achse des effektiven Schlages [16]

Für eine funktionierende mukoziliäre Selbstreinigung interagieren die Kinozilien mit der periziliären Flüssigkeitsschicht, die den ATP-basierten [17] koordinierten Zilienschlag mit einer Geschwindigkeit von 5,5 mm/min [18] (10 - 20 Hz) [19] ermöglicht, wohingegen die darüber liegende viskosere Phase den Abtransport von Fremdstoffen rachenwärts gewährleistet.

1.2 Seltene Erkrankungen mit Störungen des mukoziliären Transports

Eine seltene Erkrankung liegt vor, wenn nicht mehr als fünf von 10.000 Menschen von ihr betroffen sind. Etwa 80 % der seltenen Erkrankungen sind genetisch bedingt. Oftmals äußern sich erste Symptome bereits im Kindesalter. Die meisten Krankheiten verlaufen chronisch und mit eingeschränkter Lebenserwartung. Aufgrund der geringen Anzahl der Betroffenen ist nicht nur die Sicherstellung von guten und schnellen Behandlungs- und Versorgungsmöglichkeiten erschwert, sondern auch die Forschung, wodurch wiederum Diagnostik und Therapieansätze nur eingeschränkt zur Verfügung stehen [20].

Bei zwei seltenen Erkrankungen, die den mukoziliären Transport betreffen, handelt es sich um die zystische Fibrose (auch Mukoviszidose) und die primäre Ziliendyskinesie.

1.2.1 Zystische Fibrose

Die zystische Fibrose (CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, bei welcher die Patienten an einer Elektrolyttransportstörung leiden, die durch Mutationen im *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*-Gen verursacht wird [21]. Die Prävalenz liegt in europäischen Ländern bei ca. 1:4.000 [22]. Die erste umfassende Beschreibung von CF erfolgte im Jahr 1938 und der Begriff zystische Fibrose wurde geprägt [23].

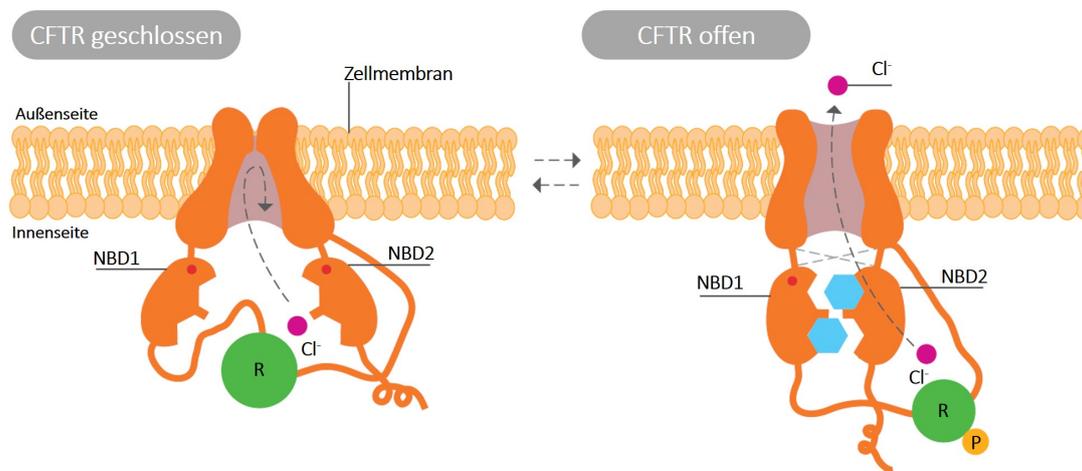


Abbildung 3: Schematische Darstellung des CFTR-Ionenkanals in geschlossener und offener Konfiguration. Die beiden transmembranübergreifenden Domänen (TMD) bilden die Kanalporen. Der Ionenkanal wird durch die ATP-bindenden und hydrolisierenden Nukleotidbindungsdomänen (NBD1 und NBD2) sowie die regulatorische Domäne (R), die zahlreiche Phosphorylierungsstellen (P) enthält, angesteuert. Die Aktivierung des CFTR erfordert die Phosphorylierung der R-Domäne, woraufhin die NBDs ATP binden und hydrolysieren und die Kanalsteuerung induziert wird. Die Kanalöffnung wird durch die Öffnung der Pore durch Schnittstellen mit den TMD über ihre extrazellulären Schleifen, die ebenfalls zur Stabilisierung des Proteins beitragen, ermöglicht. Cl⁻ = Chlorid-Ion. Modifiziert nach *Quon und Rowe*, 2016 [24]. Abdruckgenehmigung liegt vor.

Das CFTR-Gen kodiert für einen ATP-regulierten Chlorid- und Bicarbonationenkanal, der an der apikalen Membran von Epithelzellen exprimiert wird, v.a. im respiratorischen Epithel, dem Gastrointestinal- und männlichen Reproduktionstrakt [25]. CFTR zählt zur Familie der ABC- (*engl. ATP-binding cassette*) Transporter und fungiert im Gegensatz zu den anderen ABC-Transportern, die den aktiven transmembranen Transport durchführen, als Ionenkanal. Das CFTR-Protein ist aber durch die grundlegende Struktur der ABC-Transporter charakterisiert, die aus zwei Transmembrandomänen (TMD), zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) und einer verbindenden regulatorischen Domäne (R) besteht [26]. CFTR wird durch proteinkinaseabhängige Phosphorylierung seiner regulato-

1 Einleitung

rischen Domäne und ATP-Bindung an die Nukleotidbindungsdomänen reguliert, wodurch die Chlorid- und Bicarbonatsekretion gesteuert wird [27] (siehe Abb. 3). Es dient zur Aufrechterhaltung der Ionen- und Flüssigkeitshomöostase, indem es den direkten Transport von Chlorid und weiteren Anionen durch die apikale Membran verschiedener Arten von Epithelzellen vermittelt [28].

Mutationen des CFTR-Gens resultieren in schwerwiegendem Ungleichgewicht des Ionen- und Wassertransports und führen somit zu einer Vielzahl von negativen Auswirkungen in verschiedenen Organen. Die Sekretzusammensetzung in Lunge, Bauchspeicheldrüse, Leber, Darm, Schweißkanal und Nebenhoden wird dadurch stark beeinflusst. Durch die verminderte Sekretion von Elektrolyten und damit von Wasser kommt es z. B. zu einer Dehydrierung der Atemwegsflächen. Aufgrund des defekten CFTR ist nicht nur die Chlorid-, sondern ebenfalls die Bikarbonatsekretion reduziert [29], wodurch der pH Wert der Atemwegsflächenflüssigkeit erniedrigt wird und antibakterielle Mechanismen nicht mehr greifen [30, 31].

Die Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei CF-Patienten sind respiratorische Symptome [32]. Patienten leiden von Geburt an Husten, zähem Auswurf und Atemnot, da sich bei fehlendem Flüssigkeitstransport die über der Periziliarschicht liegenden Muzine aufkonzentrieren, wodurch die PCL kollabiert und die mukoziliäre Selbstreinigung versagt [33]. Des Weiteren führt eine erhöhte Produktion des Bronchialsekrets zu chronischen bakteriellen Infekten der Lunge. Dadurch können irreversible Ausweitungen der Bronchien (Bronchiektasen) entstehen und es wird vermehrt Bindegewebe, das verhärtet und vernarbt (Fibrosierung), gebildet. Es resultiert der Verlust von gesundem und funktionsfähigem Gewebe. Neben respiratorischen Symptomen prägen ebenfalls enterale Symptome das Krankheitsbild [34]. Bei 90 % der Patienten im Alter von einem Jahr werden durch eine Fehlfunktion des Pankreas Verdauungsstörungen und eine schlechte Aufnahme von Fetten und fettlöslichen Vitaminen diagnostiziert, woraus häufig ein niedriges Körpergewicht resultiert und die Patienten eine verminderte Körpergröße aufweisen [35]. 10 - 20 % der Neugeborenen leiden unter einem Darmverschluss und rund 10 % ab dem Jugendlichenalter an dem sogenannten distalen Darmverschluss-Syndrom, welches krampfartige Bauchschmerzen und verminderten Stuhlgang auslöst [36]. Neben der Produktion von hochviskosem Schleim, wird Schweiß mit hoher Salzkonzentration, der das Risiko der Dehydratation birgt, produziert [37, 38, 39, 22].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um zystische Fibrose zu diagnostizieren. Die am häufigsten angewandte Methode, die in 98 % der Fälle eine Diagnose erlaubt und als Goldstandard gilt, ist der Schweißtest nach *Gibson and Cooke*, bei welchem die Chloridkon-

1 Einleitung

zentration gemessen wird. Ist die Chloridkonzentration höher als 60 mmol/L, ist davon auszugehen, dass eine zystische Fibrose vorliegt [40, 41]. Eine alternative, dennoch teure, Methode zur CF-Diagnose bietet die genetische Analyse.

Bis heute sind über 1900 Mutationen des CFTR-Gens bekannt, welches auf dem Chromosom 7 liegt. Weniger als 20 Mutationen treten bei mehr als 0,1 % der Patienten auf und nur fünf Mutationen bei mehr als 1 % der Patienten [42]. Die am häufigsten auftretende Mutation ist F508del, bei welcher an der Stelle 508 aufgrund einer Deletion von drei Nukleotiden die Aminosäure Phenylalanin fehlt. Ca. 70 % der CF-Patienten sind davon betroffen [43]. Die Mutationen lassen sich in fünf verschiedene Klassen einordnen, wobei Mutationen, die in die Klassen I, II und III eingeordnet werden, zu einem klassischen CF-Phänotyp mit Pankreasinsuffizienz führen. Klasse IV und V Mutationen erzeugen einen teilweise funktionellen CFTR-Kanal und sind mit einer milderen Form der CF assoziiert [44]. Mutationen der Klasse I sind *nonsense* oder Spleißmutationen, die durch frühzeitige Stopp Codons charakterisiert sind und zu einem verkürzten CFTR-Protein führen (z.B. G542X). Klasse II Mutationen, wozu die am häufigsten vorkommende F508del Mutation gehört, beeinträchtigen stattdessen die Stabilität und Faltung des Proteins, sodass dieses nicht zur Zelloberfläche gelangt, sondern vorher von Proteasomen abgebaut wird [45, 46, 47]. Weit seltenere Mutationen, von denen lediglich 5 - 6 % der CF-Patienten mindestens eine aufweisen, sind in die Klassen III, IV und V eingeordnet. Klasse III beschreibt *missense* Mutationen, die den offenen Zustand des CFTR-Kanals erheblich verkürzen, was als *gating* Defekt bekannt ist (z.B. G551D). Bei Klasse IV und V Mutationen findet zwar die Translation des CFTR-Proteins statt, jedoch ist dieses an der Zelloberfläche nicht funktionsfähig oder in unzureichender Menge vorhanden. Beispiele für Mutationen der Klasse IV und V sind die D1152H- oder A455E-Mutation [48].

Noch vor 60 Jahren bedeutete die Diagnose zystische Fibrose eine sehr geringe Lebenserwartung und Betroffene überlebten selten das Kindesalter. Heutzutage liegt diese deutlich höher. Inzwischen gibt es viele verschiedene Therapieansätze, die zwar nicht zur Heilung, aber zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen. Grundlegendes Ziel ist der langfristige Erhalt des Ernährungszustandes und der Lungenfunktion sowie die Prävention der Keimbesiedlung. Zu den Therapiemöglichkeiten zählen spezielle kalorien- und fettreiche Diäten sowie Nahrungsergänzungsmittel [49, 35, 50]. Es besteht die Möglichkeit mittels Physiotherapie, gezielter Ausatemungstechniken oder sportlicher Betätigung den Sekrettransport in den Atemwegen zu erleichtern und die körperliche Grundfitness zu verbessern [35, 51]. Zur Vorbeugung und Kontrolle von wiederkehrenden und persistenten Lungeninfektionen werden Antibiotikatherapien eingesetzt. Das hochviskose Bronchialse-

1 Einleitung

kret wird mit Hilfe von Mukolytika [52] und rhDNAse (rekombinanten humanen Desoxyribonuklease I oder Dornase alfa) [53] behandelt.

Vielversprechende Therapiemöglichkeiten bieten CFTR-Modulatoren (z.B. Ivacaftor und Lumacaftor), die in der Lage sind, den grundlegenden Defekt der zystischen Fibrose zu beheben, indem sie entweder die Synthese des CFTR-Proteins beeinflussen (sog. Korrektoren) oder die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen (sog. Potentiatoren) [26]. Der genaue Mechanismus dahinter ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [54]. Der Einsatz der CFTR-Korrektoren/Potentiatoren und anderer therapeutischer Maßnahmen, die personalisierte Therapieansätze für CF-Patienten erlauben, werden genauer in Kapitel 1.3 beschrieben.

1.2.2 Primäre Ziliendyskinesie

Bei der primären Ziliendyskinesie handelt es sich um eine seltene autosomal rezessive Erkrankung mit starker Heterogenität, die durch entsprechenden Defekte in der ziliären Ultrastruktur und/oder ziliären Funktion charakterisiert ist [55]. Sie ist durch eine ziliäre Dysfunktion und einen darausfolgenden beeinträchtigten oder ausbleibenden Selbstreinigungsprozess gekennzeichnet [56].

Die Schätzungen der Prävalenz variieren aufgrund des breiten Spektrums unspezifischer klinischer Symptome, der Variation von Mutationen in verschiedenen Populationen und der unzureichenden Diagnostik, stark. Es ist davon auszugehen, dass diese in Europa bei den 5 - 14 Jährigen zwischen 1:10.000 und 1:20.000 liegt, wobei die Prävalenz in konsanguinen Populationen etwas höher ist [57, 58]. 1904 wurde von Siewert der erste Patient beschrieben, der an Bronchiektasien und *situs inversus* litt [59], woraufhin Kartagener die Symptomtrias durch Aufnahme der *Sinusitis* als drittes Symptom komplettierte [60]. Im Jahr 1976 berichtete Afzelius, dass PCD durch ultrastrukturelle Defekte der Zilien gekennzeichnet sei, die zu immotilen Zilien führen [61].

Die ziliäre Dysfunktion kann zu wiederkehrenden Infektionen in den oberen und unteren Atemwegen führen. Hierzu zählen: Die chronische Bronchitis, die zu Bronchiektasien führen kann, die chronische *Rhino-Sinusitis*, einer gleichzeitig auftretenden Entzündung der Nasenschleimhaut (*Rhinitis*) und der Schleimhaut der Nasennebenhöhlen (*Sinusitis*) und die chronische Mittelohrentzündung (*Otitis media*). In ungefähr 50 % der Fälle liegt ein *situs inversus* vor, welcher in Kombination mit chronischer *Sinusitis* und Bronchiektasien als Kartagener Syndrom bezeichnet wird. Dyskinetische Zilien können außerdem einen Einfluss auf die Embryogenese und Fortpflanzung haben. Bewegliche Zilien sind wichtig für den Vortrieb von Spermien bei Männern und den Eitransport im Eileiter der Frauen,

1 Einleitung

wodurch die mit PCD diagnostizierten Patienten ein höheres Risiko für Unfruchtbarkeit aufweisen [62].

Aufgrund des heterogenen Krankheitsbilds der PCD verzögert sich die Diagnose bei europäischen Kindern auf ein durchschnittliches Alter von ca. 5,5 Jahren und es sind mehrere diagnostische Tests notwendig [57]. Der sogenannte Saccharin-Test galt anfänglich als mögliche *Screening* Methode, wobei dieser, vor allem bei Kindern, als schwer durchzuführen und inzwischen als unzuverlässig gilt. Hierbei wird die Zeit von der Platzierung eines Stück Saccharins in der unteren Nasenmuschel bis zur süßlichen Wahrnehmung im Rachen ermittelt [63]. Die Messung von nasalem Stickstoffmonoxid (nNO) wurde mit 89 % positivem Vorhersagewert als neuer besserer *Screening* Test für die primäre Ziliendyskinesie vorgeschlagen [64, 65]. PCD-Patienten weisen wesentlich niedrigere nNO-Werte auf (Grenzwert 105 ppb) [66, 67], dennoch bleibt die genaue Ursache bisher ungeklärt [68, 69]. Da niedriges nasales NO ebenfalls ein Indikator für die CF [70] oder chronische *Sinusitis* [71] sein kann, erfordert der Mangel an Spezifität weitere fundierte diagnostische Tests zur Bestätigung der PCD bei Patienten mit niedrigem nNO. In vielen Zentren wird mittels Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie (HSVM) das Zilienschlagmuster sowie die Zilienschlagfrequenz der respiratorischen Epithelzellen, die durch nasale Schleimhautabstriche gewonnen werden, bestimmt. Zu den für die PCD charakteristischen Anomalien gehören immotile Kinozilien, kreisförmige und hyperkinetische Schlagmuster sowie Zilienschläge mit reduzierter Amplitude. Verschiedene Schlagmuster sind mit spezifischen ultrastrukturellen Defekten und somit genetischen Mutationen verknüpft. Die ultrastrukturelle Analyse von Zilienquerschnitten mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde traditionell zur Bestätigung einer PCD-Diagnose eingesetzt [72]. Da insbesondere innere Dyneinarm-Defekte, aufgrund der geringen Elektronendichte und des geringen Aufkommens entlang des Axonems, schwer zu bestimmen sind [65] und inzwischen einige PCD-Varianten bekannt sind, die eine normale Ultrastruktur aufweisen (z.B. DNAH11) [73], scheint eine Verifizierung der PCD mittels Genanalyse notwendig.

Aufgrund des heterogenen Krankheitsbilds und der daraus resultierenden erschwerten Diagnose mittels einer Vielzahl an diagnostischen Tests, wäre es wünschenswert eine garantierte und schnelle Diagnose mit Hilfe einer nicht-invasiven Methode zu erreichen. Die Raman-Spektroskopie, im Speziellen das BioRam[®]-System, das explizit für biomedizinische Anwendungen entwickelt wurde, liefert die Möglichkeit mittels nicht-invasiver und markierungsfreier Technik nicht nur fixierte, sondern auch lebende Zellen mit hoher Präzision und Spezifität zu analysieren [74]. Die Identifizierung eines potentiellen Biomarkers, nicht nur für die PCD, sondern ebenfalls für die CF, könnte einen neuartigen diagnosti-

1 Einleitung

schen Ansatz hervorbringen.

Derzeit sind 38 Gene bekannt, die mit der PCD assoziiert werden [75]. Die PCD-Gene können nach ihrer Lage und Funktion des Proteinprodukts oder nach dem funktionellen bzw. ultrastrukturellen Defekt bei den Patienten unterteilt werden (siehe Abbildung 4). Ca. 85 % der Mutationen sind *loss-of-function* Varianten (*nonsense*, *frameshift* oder defekte Spleißmutanten) und ca. 15 % konservative *missense* Mutationen [76].

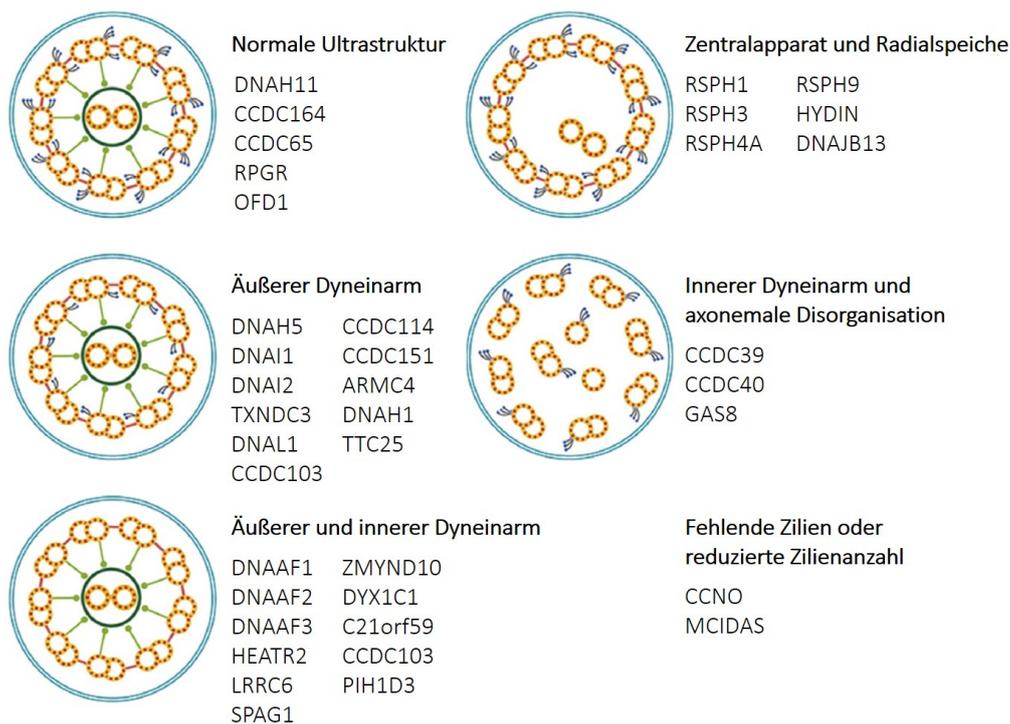


Abbildung 4: Übersicht der aktuell bekannten PCD-assoziierten Mutationen geordnet nach deren strukturellen Defekten. Aktuell sind 38 PCD-assoziierte Gene bekannt. Modifiziert nach *Horani and Ferkol*, 2018 [77]. Abdruckgenehmigung liegt vor.

Die am häufigsten vorkommenden ultrastrukturellen Defekte liegen Mutationen in Genen zu Grunde, die äußere Dyneinarmkomponenten kodieren [1]. Diese Mutationen verursachen einen typischen Defekt der axonemalen Ultrastruktur, der durch das Fehlen der ODA oder durch stark verkürzte ODA charakterisiert ist. Die zwei ersten identifizierten PCD-Gene, die zusammen mehr als 30 % aller PCD-Fälle ausmachen und ODA-Proteine kodieren, sind DNAI1 [78] und DNAH5 [79]. Wohingegen DNAI1- oder DNAH5-Mutationen immotile Kinozilien aufweisen, ist der Zilienschlag einer DNAH11-Mutation entweder normal oder hyperkinetisch mit reduzierter Amplitude. Bei einer DNAH11-

1 Einleitung

Mutation besteht die Möglichkeit eines eindeutigen klinischen Befundes einer PCD, aber die Ultrastruktur weist keinen sichtbaren Defekt auf [80]. *Castleman et al.* identifizierten zwei PCD-Gene, die Proteinkomponenten des axonemalen Radialspeichenkopfes kodieren. In der Ultrastruktur sind Anomalien in der Mikrotubulianordnung zu erkennen, die eine Abwesenheit des zentralen Paares (9+0- oder 8+1-Muster) bedeuten [81].

Bei der PCD handelt es sich um eine genetische Erkrankung, für die es bisher keine Heilungsmöglichkeiten gibt. Deshalb steht nach einer Diagnose die Verminderung der Symptome sowie das Hinauszögern des Fortschritts der Krankheit im Vordergrund. Die *2009 ERS Task Force Consensus in Children* [65] sowie die *2016 North American PCD Foundation Consensus* [75] empfehlen alle sechs Monate regelmäßige Untersuchungen, die in spezialisierten Zentren durchgeführt werden. Hierbei werden unter anderem Lungenfunktionstests durchgeführt [82]. Um bakterielle Infektionen unter Kontrolle zu bringen, werden diese schnellstmöglich mit Antibiotika behandelt. Weitere Behandlungsmöglichkeiten bieten Bronchodilatoren, inhalative Mukolytika sowie Physiotherapie und mechanische Hustenunterstützung [83]. Da der Zilienschlag durch β adrenerge Agonisten stimuliert werden kann [84], finden unter anderem Substanzen wie Salbutamol ihren Einsatz.

Die Identifizierung etlicher PCD-assoziiierter Gene und der Mangel an spezifischen Therapiemöglichkeiten haben die Gentherapieforschung zur Behandlung der PCD vorangetrieben. Mit dem Ziel, die Genfunktion dauerhaft wiederherzustellen und die Zilienfunktion und somit die Abwehrfunktion zu normalisieren, konnte gezeigt werden, dass der DNAH11-Gendefekt *ex vivo* mittels Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektor-Nukleasen (TALENs) repariert werden konnte [85].

1.3 Personalisierte Medizin im Hinblick auf die seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie

Krankheiten, die das respiratorische System betreffen, teilen biologische Mechanismen und weisen ähnliche klinische Phänotypen auf, jedoch erklärt und begründet deren Heterogenität die Notwendigkeit eines personalisierten Therapieansatzes [86]. Seit jeher ist es die Aufgabe des Arztes, Patienten individuell zu betreuen, um bessere Ergebnisse zu erzielen, wodurch die personalisierte Medizin schon lange besteht. Dennoch wurde im Jahr 1999 der Begriff insofern erstmalig in einen neuen Kontext gebracht [87]. Nach *Jameson und Longo* definiert sich die personalisierte Medizin als individualisierte Behandlung, die den Einsatz neuer Diagnostika und Therapeutika umfasst, die auf die Bedürfnisse eines Patienten zugeschnitten sind und auf individuellen genetischen, phänotypischen oder psychosozialen Eigenschaften beruhen. Deren Ziel ist es, die klinischen Ergebnisse für einzelne

1 Einleitung

Patienten zu verbessern und unnötige Nebenwirkungen für diejenigen zu minimieren, die weniger wahrscheinlich auf eine bestimmte Behandlung ansprechen [88].

Für die CF und die PCD liegt bis heute kein für alle Patienten zufriedenstellender Behandlungsansatz vor. Da die personalisierte Medizin eine gezielte, patientenspezifische Therapie ermöglichen soll, kann sie als vielversprechende Strategie gesehen werden.

Die personalisierte Medizin der CF beinhaltet die Entwicklung sog. CFTR-Modulatoren, die auf den grundlegenden Defekt im CFTR-vermittelten Chloridtransport, der auf individuellen Genotypen basiert, abzielen [89]. Zu diesen Arzneistoffen zählt unter anderem das 2012 als erstes mutationsspezifisch eingesetzte Therapeutikum Ivacaftor (VX-770), ein pharmakologischer Potentiator, der durch Klasse III *gating*-Mutation (z.B. G551D) defekte CFTR an der Zelloberfläche aktiviert. In zulassungsrelevanten Studien wurde eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion und Reduktion pulmonarer Störungen gezeigt sowie eine kontrollierbare Gewichtszunahme. Daraus resultierte nicht nur eine verbesserte Lebensqualität, sondern vor allem eine verlängerte Lebensdauer [90, 91, 26]. Ebenso konnte *in vitro* der G551D-vermittelte, defekte Chloridtransport auf 50 % der Wildtyp Funktion wiederhergestellt werden [92]. Da diese Form der Therapie bei deutlich weniger als 10 % der CF-Betroffenen wirksam ist, wurde die Kombination aus Ivacaftor und dem CFTR-Korrektor Lumacaftor für den F508del CFTR-Genotyp untersucht, um für 50 % der CF-Betroffenen in Deutschland einen Therapieansatz zu schaffen. Es wurde gezeigt, dass der Chloridtransport in bronchialen Epithelzellen von CF-Patienten 25 % des Wildtyp des CFTR entsprach, wenn beide in den maximal wirksamen Konzentrationen zugegeben wurden [93]. Zudem zeigte die Kombination aus Ivacaftor und Lumacaftor eine leichte Verbesserung der Lungenfunktion und eine signifikante Reduzierung der Exazerbationen um 39 - 61 % [94].

Dennoch verbleiben mehr als 40 % der Betroffenen, die an weiteren genetischen Defekten leiden, ohne vernünftigen Therapieansatz [89]. Für diese stehen zur Zeit das personalisierte Infektionsmanagement, das den Einsatz von passenden Antibiotika zur Bekämpfung chronischer Infektionen beinhaltet, sowie verschiedene Protokolle für individualisierte Atemphysiotherapie oder die mukolytische Inhalationstherapie (7 % NaCl) zur Verfügung [89, 95]. Da ca. 85 % der CF-Patienten zusätzlich an einer Pankreasinsuffizienz leiden, findet eine Ernährungstherapie statt, die Ersatz der Pankreasenzyme und Substitution fettlöslicher Vitamine beinhaltet, um die schlechte Fett- und Proteinabsorption zu behandeln. Dadurch können Kinder ein altersgerechtes Wachstum und eine angemessene Gewichtszunahme erreichen [89].

1 Einleitung

Gentherapeutische Maßnahmen bieten die Möglichkeit den Genotyp der Patienten korrigieren [96]. Bisher wurden verschiedene virale Vektoren für die Verabreichung des CFTR-Gens in respiratorische Epithelzellen untersucht. *Zabner et al.* lieferten mit Hilfe von an Adenoviren gekoppelter CFTR-DNA die Basis für zukünftige Studien [97]. Der Mangel an Rezeptoren für die eingesetzten Adenovirustypen verhinderte jedoch einen signifikanten Gentransfer in diese Zielzellen [28]. Daraufhin wurden adeno-assoziierte Viren eingesetzt, für die Rezeptoren an der epithelialen Oberfläche vorhanden sind [98]. Immunreaktionen müssen zukünftig vermieden werden und eine dauerhafte Genexpression nach einer einzigen Dosierung erreicht werden. Mit Hilfe eines lentiviralen Vektors in CF-*knockout*-Mäusen wurde die partielle Korrektur des Chloridtransports nachgewiesen [99]. Als weitere Alternative zur Minimierung des Immunogenitätsrisikos und der Toleranz gegenüber repetetiver Verabreichung, wurde die nicht-virale CFTR-Gentherapie bei Patienten mit CF untersucht, wobei diese weitere Verbesserungen in deren Wirksamkeit und Zuverlässigkeit erfordert [100]. Als zukünftige Therapieoption gelten Nukleasen, z. B. CRISPR/Cas9, die zur DNA-Editierung eingesetzt werden können. Diese befinden sich aber noch im präklinischen Stadium. Bis gentherapeutische Maßnahmen ihren Durchbruch erlangen, gelten mutationsspezifische Therapien, die darauf abzielen, den grundlegenden molekularen Defekt zu korrigieren oder zu umgehen, als potentieller neuer therapeutischer Ansatz [101]. Diese Art von Therapeutika ist spezifisch für Patienten mit Klasse I-Mutationen, deren Krankheit auf vorzeitige Stopcodons (PTCs, *engl. premature termination codon*) zurückzuführen ist, durch welche die Proteinsynthese gestört ist und in verkürzte nicht-funktionale Proteine resultiert [101]. Ein Beispiel hierfür ist PTC124, das entwickelt wurde, um die Gen-Transkription bei Patienten zu korrigieren, indem die Erkennung von Stopcodons gehemmt ist und anstelle des Kettenabschlusses eine Aminosäure in die Polypeptidkette eingebaut wird [101, 102]. Für PTC124 konnte bereits in einer Phase II-Studie für CF-Patienten der positive Einfluss auf die Lungenfunktion gezeigt werden [102]. Ebenfalls können Aminoglykosid-Antibiotika (z.B. Gentamicin) mit eukaryotischer rRNA interagieren, woraus eine Konformationsänderung der RNA resultiert und die Codon-Anticodon-Paarung nicht mehr gewährleistet wird. Somit wird die Translation bis zum ursprünglichen Ende des Transkripts fortgesetzt und eine teilweise Wiederherstellung der Kanalfunktion kann erfolgen [103]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien haben gezeigt, dass Aminoglykoside PTCs im CFTR-Gen ablesen können und funktionelle CFTR-Proteine in voller Länge produziert werden [104, 105]. Aufgrund einer ausgeprägten Nephro- und Ototoxizität ist die längerfristige systemische Behandlung mit einem Aminoglykosid wie Gentamicin nur bedingt möglich [32].

1 Einleitung

Die personalisierte Medizin der primären Ziliendyskinesie ist im Gegensatz zur zystischen Fibrose weitestgehend unerforscht. Für die PCD ist bisher keine Heilung möglich, weshalb derzeitige Ansätze hauptsächlich darauf abzielen, die mukoziliäre Selbstreinigung zu verbessern und die Infektionen der Atemwege zu verhindern bzw. zu behandeln [101]. Da der Mukus jedoch in CF- und PCD-Patienten ähnliche biophysikalische Eigenschaften aufweist [106], werden viele Verfahren, die bei CF angewandt werden, auf die PCD übertragen. Hierzu zählen zum Beispiel osmolare Therapeutika wie hypertone Kochsalzlösung, die die Hydratation der Atemwegsoberfläche erhöht und somit die mukoziliäre Selbstreinigung verbessert. Ebenfalls wird auf antiphlogistische Therapeutika sowie die Reduktion der Mukusproduktion abgezielt.

Ähnlich zystischer Fibrose gelten mutationsspezifische Therapien als potentieller neuer therapeutischer Ansatz, indem oral bioverfügbare Verbindungen vorzeitige Stopcodons in *nonsense*-Mutationen ablesen können [101]. Da die meisten bekannten DNAH5-Mutationen bei PCD-Patienten *nonsense*-Mutationen sind, könnte der primäre Defekt bei diesen Patienten möglicherweise korrigiert werden. Allerdings wurden bisher in PCD-verursachenden Genen keine Studien veröffentlicht und es gibt keinen Aufschluss über das therapeutische Potential dieses Ansatzes. Dennoch stellt die Stimulation durch derartige Medikamente eine Alternative zur bisher erfolglosen Gentherapie dar [107, 108].

1.4 Tissue Engineering

Das *Tissue Engineering* ist ein interdisziplinäres Feld, das Prinzipien und Methoden des Ingenieurwesens und der Lebenswissenschaften in der regenerativen Medizin kombiniert. Es dient zur Entwicklung von individuellen biologischen Ersatzstrukturen, die zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion führen [109, 110].

Speziesdiversität beschreibt den Unterschied zwischen Tier und Mensch im Bezug auf die zugrunde liegende Biologie. Diese Artenunterschiede beinhalten Unterschiede des Immunsystems aufgrund diverser Umwelteinflüsse oder Genotyp-Phänotyp Varianzen. Letztere führen dazu, dass Tiermodelle zwar als Analogon zum Erforschen allgemeiner Grundlagen, nicht aber spezifischer Details, dienen. Forschungsergebnisse können demnach nicht zuverlässig auf andere Arten übertragen werden und präklinischen Modellen fehlt die Komplexität, die erforderlich ist, um den menschliche Organismus nachzuahmen und die klinische Effektivität und Sicherheit vorherzusagen [111].

Testsysteme, die auf bioartifiziellem Gewebe basieren, dienen als sinnvolle Alternative zu Tiermodellen für die Untersuchung pharmakologischer Substanzen oder Kosmetika bzw.

1 Einleitung

zur Aufdeckung patientenspezifischer Therapien. Zudem postulierten *Russell und Burch* im Jahr 1959 das 3R-Prinzip, welches sich als Ziel setzt, Tierversuche vollständig zu vermeiden (*replace*), die Zahl der Tiere zu reduzieren (*reduce*) und ihr Leiden auf das unverzichtbare Minimum zu beschränken (*refine*) [112, 113, 114].

Eine Art zur Erzeugung von bioartifiziellem Gewebe ist die Entnahme von endogenem Zellmaterial aus gesunden Körperpartien, die anschließend *in vitro* expandiert und auf biokompatiblen 3D-Gerüstmaterialien ausgesät werden [115]. Es wird zwischen synthetisch hergestellten und natürlichen, biologisch abbaubaren Matrices unterschieden [110]. Synthetische Matrices, wie Polyethylenterephthalat (PET), bieten den Vorteil, die Materialeigenschaften im Hinblick auf Festigkeit, Abbau, Mikrostruktur und Permeabilität zu bestimmen. Natürliche Gerüststrukturen, z. B. Kollagen, ahmen die extrazelluläre Matrixkomponenten der Zellen besser in deren Komplexität nach. Diese bieten ihnen somit eine ideale Umgebung für Zelladhäsion, Proliferation, Migration, Differenzierung und gleichzeitig eine angemessene biomechanische Unterstützung [110, 116, 117, 118].

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Trägerstrukturen bietet die Dezellularisierung von Organen, welche in ein dreidimensionales biologisches Gerüstmaterial organspezifischer Architektur resultieren, das reich an Wachstumsfaktoren ist [118]. Das Ziel der Dezellularisierung ist es, die extrazelluläre Matrix von nativen Zellen und DNA zu befreien, gleichzeitig aber die strukturellen und biomechanischen Eigenschaften zu erhalten [119]. Ein Beispiel hierfür ist die BioVaSc-TERM[®] (***Biological Vascularized Scaffold***), die aus dem Dünndarm des Schweins gewonnen wird und am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (LTERM) in Würzburg intensive Anwendung findet [120]. Es wurde bereits gezeigt, dass Segmente der BioVaSc-TERM[®] unter anderem zum Aufbau von 3D-Vollhautäquivalenten sowie intestinalen oder respiratorischen Testsystemen herangezogen werden können [113, 121, 122].

Das *Tissue Engineering* bietet ebenfalls die Möglichkeit zur Entwicklung von patientenspezifischen 3D-Atemwegstestsystemen sowie von individualisierten Krankheitsmodellen. Auf Grundlage dieser Modelle besteht die Möglichkeit personalisierte Medizin im Hinblick auf seltene Atemwegserkrankungen wie zum Beispiel zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie auszuführen.

1.5 Modellorganismen und Testsysteme für die seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie

Bei der CF und der PCD handelt es sich um zwei genetisch bedingte seltene Erkrankungen, deren heterogene Phänotypen effektive und insbesondere individualisierte Behandlungsmethoden benötigen, um eine Vielzahl von Patienten anzusprechen. Im Folgenden wird auf verschiedene Modellorganismen sowie mögliche Testsysteme eingegangen, die sowohl zum Verständnis der Pathogenese als auch zur Validierung verschiedener Therapeutika eingesetzt werden.

Ein vielversprechendes CF-Modellsystem zum Testen von CFTR-Modulatoren stellen darmspezifische Organoide, die aus Stammzellen des Darmgewebes von Patienten gewonnen werden, dar. Die Aktivierung von CFTR führt zu einer Schwellung der Organoide [123]. Da CFTR primär an der apikalen Oberfläche von kinzilientragenden Zellen exprimiert wird, sind Atemwegsorganoide bzw. -spherioide gleichermaßen für die Bestimmung der CFTR-Funktionalität relevant [124, 125]. Des Weiteren konnte an respiratorischen Epithelzellen, die aus induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSC) von Patienten mit zystischer Fibrose gewonnen wurden, *in vitro* die mutationsspezifische Medikamentenreaktion analysiert werden [24, 126]. Die Analyse von primären Atemwegszellen eines G551D/F508del-Donors lieferte die präklinischen Daten, die die Behandlung mit Ivacaftor rechtfertigte, obwohl das Tiermodell keine Wirksamkeitsdaten aufzeigte [92]. Durch die Klonierung des CFTR-Gens ist es möglich, CF-Mäuse zu erzeugen, die den grundlegenden Ionentransportdefekt ausbilden, welcher durch homologe Rekombination oder durch Einführung spezifischer Mutationen behoben werden konnte [127, 128]. Der gastrointestinale Phänotyp konnte mit Hilfe des Mausmodells abgebildet werden, jedoch verursachte der defekte Ionentransporter keine CF-ähnlichen Atemwegserkrankungen [129, 130]. Aufgrund der sich ähnelnden Lungenarchitektur- und -physiologie bieten Frettchen und Schweine eine weitaus bessere Alternative zum CF-Mausmodell und für beide Spezies wurden bereits erfolgreiche CFTR-*knockouts* erreicht [131, 132].

Da die Architektur von Zilien bzw. flagellaren Axonemen bei lebenden Organismen evolutionär konserviert ist [133], wurde Pionierarbeit sowohl zur Strukturaufklärung, Charakterisierung der Proteinzusammensetzung, als auch zur Identifizierung von Genen, die eine Rolle in der axonemalen Anordnung spielen, mit der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* geleistet [134]. In größeren Modellorganismen, wie dem Zebrafisch (*D. rerio*), wurde die Identifizierung und Validierung von PCD-Kandidatengenen und deren Funktion bei der Ziliarmotorik ermöglicht. Trotzdem weisen Einzeller, wie *Chlamydomonas reinhardtii*, oder multizelluläre Organismen, wie *D. rerio*, wesentliche Unterschiede zur humanen axonema-

1 Einleitung

len Struktur und Funktion auf, wodurch keines von ihnen den Phänotyp der Ziliopathie vollständig abbildet [135]. Mausmodelle gelten daher als potentieller Modellorganismus, da viele Aspekte der PCD, wie z.B. defekte mukoziliäre Selbstreinigung, *Rhinitis* und *Sinusitis* sowie Situsanomalien nachweisbar sind. Dennoch bildet das Mausmodell den humanen Phänotyp nicht komplett ab, da die Störung wesentlicher ziliärer Gene bei Mäusen zu einer hohen Inzidenz von tödlichem Hydrozephalus führt und diese keine für die PCD charakteristischen Bronchiektasien entwickeln [129, 136, 137].

Aufgrund der niedrigen Korrelation der Modellorganismen zum PCD-Phänotyp, gelten *in vitro* Testsysteme, die mit Hilfe von humanen Primärzellen etabliert werden, als ein neuer potentieller Ansatz. Diese bieten den Vorteil personalisierte Therapieansätze *in vitro* zu testen und die bestmögliche individualisierte Therapie zu gewährleisten. Dennoch ist eine Standardisierung dieser Testsysteme aufgrund der Knappheit an Spenderzellen und der Donor-zu-Donor-Variabilität schwer zu realisieren, wodurch *high-throughput screenings* potentieller Therapeutika für eine Vielzahl an PCD-Patienten ausgeschlossen sind. Es besteht die Möglichkeit, diese Barriere durch die Generierung einer PCD-Zelllinie zu überwinden. Primärzellen weisen jedoch eine geringe Passagierkapazität auf [138], wodurch sie für genetische Modifikationen ungeeignet sind. Zur Generierung einer PCD-Zelllinie, beispielsweise mittels des CRISPR/Cas9-Systems, ist eine respiratorische Epithelzelllinie erforderlich, die in 3D den mukoziliären Phänotyp ausbildet und funktionale Kinozilien auf mindestens 60 % der apikalen Modelloberfläche aufweist, um die *in vivo* Situation vollständig abzubilden [139]. Es konnten bereits in einigen Studien mit zelllinienbasierten 3D-Gewebemodellen Kinozilien auf der Modelloberfläche identifiziert werden. *Benediktsdottir et al.* berichteten, dass in 3D-Gewebemodellen der Zelllinie VA10 auf Transwells, die unter *Airlift*-Bedingungen kultiviert wurden, 15 % der Oberfläche mit Kinozilien bedeckt war und diese eine ziliäre Schlagfrequenz von 6 - 7 Hz zeigten [140]. *Vaughan et al.* dokumentierten, dass die Zelllinie HBEC3-KT auf Kollagengelen in zilientragende Zellen differenzierte, wobei es nur wenige Informationen zu deren Funktionalität gibt [141].

Humane induziert pluripotente Stammzellen gelten aufgrund ihrer Verfügbarkeit und ihrem definierten Genotyp als weitere Plattform zur Untersuchung der Pathogenese sowie neuer Therapieansätze. Da hiPSC während einer längeren Kultivierungsdauer genetische Anomalien entwickeln können, ist die routinemäßige Überwachung des Genoms notwendig, um die Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp sicherzustellen und so die Sicherheit bei therapeutischer Anwendung zu bestätigen. Bisher wurden einige Protokolle zur Differenzierung von Stammzellen in zilientragende Epithelzellen veröffentlicht [142, 143, 144, 145], deren Zellpopulationen sich jedoch vom gesunden Atemwegsepithel unterscheiden

1 Einleitung

können [135]. PCD-Testsysteme, die nicht auf hiPSC basieren, sind bisher lediglich für Spheroidkulturen gezeigt worden [146].

Aufgrund der Einschränkungen der verschiedenen genannten Modellorganismen und bereits bestehenden Testsysteme, ergibt sich der große Bedarf an einem donors-spezifischen CF- sowie PCD-*in vitro* Testsystem. Diese ermöglichen nicht nur die Untersuchung der Pathogenese, sondern vor allem die Anwendung verschiedener Therapeutika hinsichtlich personalisierter Medizin im individuellen 3D-Testsystem. Alternativ bietet die Identifizierung einer geeigneten Atemwegsepithelzelllinie die Möglichkeit zur Generierung einer PCD-Zelllinie, mit Hilfe derer standardisierte Gewebemodelle aufgebaut werden können und anschließend dem Genotyp entsprechende Therapiemöglichkeiten erforscht werden können.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, ein donorspezifisches 3D *in vitro* Modell für die seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie zu etablieren, welches als Testsystem für potentielle Therapeutika in der personalisierten Medizin Anwendung findet.

In vorheriger Arbeit konnte der Aufbau eines 3D-Modells mit tracheobronchialen Epithelzellen in Ko-Kultur mit Fibroblasten auf einer biologischen Matrix gezeigt werden [122]. Des Weiteren wurden Vorarbeiten zum Modellaufbau eines 3D-Atemwegmodells basierend auf nasalen Epithelzellen und Fibroblasten durchgeführt [147]. Bisher fehlte jedoch die Aufklärung der Ultrastruktur sowie Informationen bezüglich des ziliären Apparats und der ziliären Funktionalität.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein donorspezifisches 3D-Atemwegsmodell mit respiratorischen Epithelzellen und Fibroblasten aufgebaut werden, das auf der biologischen Matrix SIS und der synthetischen PET-Membran basiert. Um eine hohe *in vivo* Korrelation zu bestätigen, bestand eine Aufgabe darin, vor Ort eine Methode zur Analyse der ziliären Aktivität zu etablieren. Die Gewebemodelle sollten zuerst qualitativ und anschließend quantitativ auf deren Zilienschlagfrequenz und mukoziliären Transport untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von isotoner Kochsalzlösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz der Primärmodelle basierend auf der SIS analysiert werden. Des Weiteren sollte eine am LTERM neue Methode zur Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen etabliert werden. Diese gewährleistet nicht nur eine neue Art der Zellgewinnung *per se*, sondern vor allem die schnelle und einfache Zellgewinnung von Patienten, auch im Kindesalter, die zur Generierung eines individuellen Krankheitsmodells dienen. Respiratorische Epithelzelllinien bieten aufgrund ihrer verlängerten Lebensdauer im Vergleich zu Primärzellen die Möglichkeit, krankheitsspezifische Zelllinien mittels genetischer Modifizierungen zu generieren. Deshalb bestand eine Aufgabe darin, neben 3D-Modellen basierend auf nasalen und tracheobronchialen Primärzellen, vier Atemwegzelllinien (HBEC3-KT, Calu-3, Cl-huAEC und VA10) im 3D-Modell im Hinblick auf deren mukoziliären Phänotyp zu untersuchen. Final sollte der Aufbau der Krankheitsmodelle von CF- und PCD-Patienten stattfinden. Die patienteneigenen Zellen sollten in 2D mit Hilfe der Raman-Spektroskopie nicht-invasiv und bezüglich Biomarkern untersucht werden, die Einsatz in der klinischen Diagnostik finden könnten. Die Krankheitsmodelle sollten hinsichtlich deren Histomorphologie untersucht werden. In CF-Modellen sollte neben der Zilienschlagfrequenz der mukoziliäre Transport analysiert werden. In PCD-Modellen sollten strukturelle ziliäre Defekte mittels ultrastruktureller Analyse aufgeklärt werden.

3 Material

3.1 Biologisches Material

Biologisches Material, das in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Tabelle 1 aufgeführt. Zum Aufbau humaner Atemwegsmodelle wurden dezellularisierte Segmente des Jejunums aus dem Schwein als Trägerstruktur verwendet. Hierfür wurden Schweine der deutschen Landschweinrasse herangezogen.

Zur Zellisolation wurden humane Biopsien bereitgestellt. Die humanen nasalen Schleimhautpräparate sowie die nasalen Schleimhautabstriche wurden von Herrn PD Dr. med. Stephan Hackenberg aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen in Würzburg zur Verfügung gestellt. Prof. Dr. med. Thorsten Walles stellte, zunächst aus der Herz-Thorax-Chirurgie in Würzburg und anschließend aus der Universitätsklinik Magdeburg für Herz- und Thoraxchirurgie, humanes tracheobronchiales Resektionsmaterial bereit. Die Patienten erteilten vor der Operation die Einwilligung nach Aufklärung und die Studien wurden von den institutionellen Ethikkommissionen für Humanforschung der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (<Votum 163/17) bzw. der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Votum 182/10 und 179/17) genehmigt.

Die nasalen Schleimhautabstriche der PCD-Patienten wurden von Herrn Prof. Dr. Helge Hebestreit und von Herrn Dr. Florian Segerer aus der Kinderklinik in Würzburg entnommen. Die Patienten erteilten vor dem Eingriff die Einwilligung nach Aufklärung und die Studien wurden von den institutionellen Ethikkommissionen für Humanforschung der der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Votum 182/10 und 179/17) genehmigt.

Die humane Atemwegsepithelzelllinie Calu-3 wurde aus einem submukosalen Lungenadenokarzinom eines 25-jährigen Mannes isoliert und kommerziell erhältlich. Bei der HBEC3-KT Zelllinie handelt es sich um eine durch CDK4- und hTERT-immortalisierte humane bronchiale Epithelzelllinie aus einer 65-jährigen Frau, die ebenfalls kommerziell erhältlich ist. Die Atemwegsepithelzelllinie VA10 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Gudmundur Hrafn Gudmundsson der Universität Island zur Verfügung gestellt, wohingegen die humane Atemwegsepithelzelllinie Cl-huAEC von inSCREENex zur Testung zur Verfügung gestellt wurde.

3 Material

Tabelle 1: Übersicht des biologischen und humanen Materials sowie der humanen Zelllinien

Tier, Biopsat, Zelllinie	Herkunft
Schwein, Deutsche Landrasse	Niedermayer, Dettelbach
Hum. nasales Gewebe	HNO Würzburg, PD Dr. med. S. Hackenberg Kinderklinik Würzburg, Prof. Dr. H. Hebestreit Kinderklinik Würzburg, Dr. F. Segerer
Hum. tracheobronchiales Gewebe	Herz-Thorax-Chirurgie Würzburg und Magdeburg, Prof. Dr. med. Thorsten Walles
CF Zellen (F508del)	Epithelix
HBEC3-KT	ATCC, <i>CRL</i> – 4051 TM
Calu-3	ATCC, <i>HTB</i> – 55 TM
VA10	Universität Island, Prof. Dr. Gudmundur Hrafn Gudmundsson
CI-huAEC K9F9	inSCREENex, INS-CI-1011

3.2 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht der in der Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	pH-Wert	Hersteller und Katalognummer
acetyliertes Tubulin	Maus	1:2000	6	Sigma (T7451)
β -Tubulin	Maus	1:2000	9	Sigma (T8328)
Cytokeratin 5	Maus	1:100	9	DAKO (M7237)
Cytokeratin 14	Kaninchen	1:1000	6	DAKO (M7010)
Cytokeratin 18	Kaninchen	1:100	9	Sigma (HPA023040)
Muc5ac	Maus	1:1000	6	Thermo Fisher Scientific (MA1-38223)
Muc5b	Kaninchen	1:100	6	Sigma (HPA008246)
Vimentin	Kaninchen	1:3000	6	Abcam (ab92547)
Sekundärantikörper				
Alexa 555 anti Maus	Esel	1:400		Invitrogen (A-31570)
Alexa 488 anti Hase	Esel	1:400		Invitrogen (A-21206)

3.3 Chemikalien

Tabelle 3: Übersicht der Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Lieferant	Katalognr.
Albumine Fraktion V (BSA)	Carl Roth (D)	9592.1
Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik- Systeme (D)	ALI20R500
Anti-Anti	Thermo Fisher Scientific (D)	15240062
DAPI Fluoromount-G	Southern-Biotech (USA)	SBA-0100-20
Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH (D)	00-311-050
Desoxycholsäure Natriumsalz ($\geq 98\%$)	Carl Roth (D)	3484.2
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Roche (D)	10104159001
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (D)	D2438
Dynabeads TM	Thermo Fisher Scientific (D)	10003D
Entellan	Merck Millipore (D)	107960
Eosin 1 %, wässrig	Morphisto (D)	10177
EMbed-812-Kit	Science Services (D)	E14120-DMP
Ethanol absolut	Carl Roth (D)	9056.4
Ethanol 96 % vergällt	Carl Roth (D)	T171.4
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio&SELL (D)	FCS.ADD.0500
Glutaraldehyd	Science Services (D)	E16220
Hämatoxylin	Morphisto (D)	10231
Incidin Plus	Ecolab Healthcare (D)	3011520
Isopropanol	Carl Roth (D)	
Isopropanol $\geq 99,8\%$	Sigma Aldrich (D)	33539- 4X2.5L-M
Kollagenase NB4	Serva (D)	17454.01
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (D)	HX00.3
Osmium Tetroxid	Science Services (D)	E19110
Paraffin	Carl Roth (D)	6642.6
Penicillin/Streptomycin (100-fach)	Sigma-Aldrich (D)	P4333
PBS-Pulver (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom GmbH (D)	L182-50
PBS-Lösung (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom GmbH (D)	L182-50
PBS-Lösung (mit Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom GmbH (D)	L182-50
Roticlear	Carl Roth (D)	A538.5

3 Material

Roti [®] -Histofix 4 %	Carl Roth (D)	P087.3
Salbutamol Fertiginhalat	Ratiopharm	
Triton X-100	Sigma Aldrich (D)	X100
Trypanblau 0,4 %	Sigma Aldrich (D)	P7949
Trypsin/EDTA-Stammlösung, 0,5 % (10-fach Konzentrat)	Invitrogen (D)	15400-054
Tween [®] – 20	Sigma Aldrich (D)	P7949
Uranylacetat	Merck Millipore (D)	8473
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (30%)	Sigma-Aldrich (D)	216763
Xylol	Carl Roth (D)	9713.3
Zitronensäure Monohydrat	VWR (D)	1.00244.1000

3.4 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 4: Übersicht der Nährmedien für die Zellkultur

Nährmedium	Zusammensetzung
Airway Epithelial Growth Medium (AECG)	AECG mit beigefügten Supplementen 1-3
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM (4,5 g/l Glucose) + 10 % FCS
Minimum Essential Medium (MEM)	MEM + 10 % FCS + 1 % Natrium-Pyruvat
Defined Keratinocyte-SFM (K-SFM)	K-SFM mit beigefügtem Wachstumsfaktor
huAEC Medium (Epithelix)	
MucilAir Medium (Epithelix)	
huAEC Medium (inSCREENex)	

3.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Übersicht der Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Citratpuffer 20 mM	3,84 g/l Citronensäure Monohydrat in VE Wasser, pH 6
TRIS/EDTA	100 mM TRIS Base

3 Material

PBS ⁻ /EDTA	10 mM EDTA, pH 9 500 ml PBS ⁻ -Lösung 500 µl Na ₂ -EDTA · 2 H ₂ O
Waschpuffer (PBS-T)	10 % (v/v) PBS 0,5 % (v/v) Tween [®] – 20 in VE Wasser

3.6 Verbrauchs- und Labormaterialien

Tabelle 6: Übersicht der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Aluminiumfolie	Hartenstein (D)
Autoklavierbeutel	Hartenstein (D)
Deckgläschen (24x60 mm)	Menzel-Gläser (D)
Deckgläschen rund (12 mm)	Marienfeld (D)
Einmalpipetten, Polystyrol: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (D)
Einbettkassetten	Klinipath (NL)
Fettstift	Dako (D)
Filterpapier zum Einbetten	Labonord (D)
Fusselfreie Tücher	Hartenstein (D)
Kryoröhrchen	VWR (D)
Microwells	Prof. Dr. Rädler Ludwig-Maximilians-Universität München
Mikrotomklingen	pfm Medical (D)
Nitril-Handschuhe	Medline International (D)
Objektträger: unbeschichtet (26x16x1 mm)	Menzel (D)
Polysine (25x75x1 mm)	Langenbrinck (D)
Parafilm	Carl Roth (D)
Pasteurpipetten, Glas	Brand (D)
Petrischalen 60x15 mm	TPP Techno Plastik Products (CH)
Petrischalen 145x20 mm	TPP Techno Plastik Products (CH)
Pipettenspitzen: 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf (D)

3 Material

Reaktionsgefäße: 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf (D)
Skalpellklingen, abgerundet	Bayha (D)
Transwell Zellkultur-Inserts transluzent, 0,4 μm Porengröße	Greiner Bio-One (D) Artikelnr. 665640
Wägeschalen	Hartenstein (D)
Zellkulturflaschen, unbeschichtet: 25 cm^2 , 75 cm^2 , 150 cm^2	TPP Techno Plastik Products AG (CH)
Zellkulturflaschen, CELLCOAT Kollagen I-beschichtet: 25 cm^2 , 75 cm^2	Greiner Bio-One (D)
Zellkultur MultiWellplatten: 6-, 12-, 24-, 96-Well	TPP Techno Plastik Products AG (CH)
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (D)

Tabelle 7: Übersicht der Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller/Lieferant
Bechergläser Glas	Schott (D)
Bechergläser Plastik	Bürkle (D)
Einfrierhilfe Mr. Frosty	VWR (D)
Gestell für Reaktionsgefäße	neoLab (D)
Gestell für Zentrifugenröhrchen	neoLab (D)
Glasflaschen	Brand (D)
Glaspipetten	Brand (D)
Handstückzähler	neoLab (D)
Kälteschutzhandschuhe	VWR (D)
Löffelspatel	Hartenstein (D)
Magnetrührstäbchen	Hartenstein (D)
Messkolben	Hirschmann Laborgeräte (D)
Messzylinder Glas	Brand (D)
Messzylinder Plastik	Vitlab (D)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (D)
Objektträgerhalter Glas (Glas, Edelstahl)	Mercateo (D)
Paraffin-Ausgießform	Labonord (D)

3 Material

Pinzetten	Omnilab-Laborzentrum
Pipetten (10, 100, 1000 μ l)	Eppendorf (D)
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand (D)
Rührfisch	Hartenstein (D)
Schutzbrille	neoLab (D)
Skalpellklingenhalter	Bayha (D)
Spatel	Hartenstein (D)
Trichter	Hartenstein (D)
Zellkronen	GT-Labortechnik (D)
	Design Lst. f. Tissue Engineering und Regenerative Medizin

3.7 Laborgeräte

Tabelle 8: Übersicht der Laborgeräte

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Absaugsystem	Vacusafe	Integra Biosciences (D)
Abzug		Prutscher Laboratory Systems (A)
Analysenwaage	LC220S	Sartorius (D)
Aufblockstation	EG1150H	Leica Mikrosysteme (D)
Autoklaven	Technoclav	Integra Biosciences (D)
	DX-45, VX-150	Systec (D)
BioRam [®]		CellTool (D)
Brutschrank	Heraeus BB 6220	Thermo Electron LED (D)
Dampfgarer	Multiquick FS20	Braun (D)
Dampftopf	Varioklav Typ 400DT	HP Medizintechnik (D)
Drehschieberpumpe	RZ6	Vacuubrand (D)
Einbettautomaten	Microm STP120	Thermo Fisher Scientific (D)
	TES Valida	Medite (D)
Einbettkassetten- beschriftungsgerät	VCP-5001	Vogel Medizintechnik (D)
Einhängethermostat	Alpha A	Lauda (D)
Eismaschine	AF-80 Scotsman	HIBU Eismaschinen (D)
Flüssigstickstofftank	MVE 815 P190	German-cryo (D)

3 Material

Gefrierschränke	–80° C HFU586 Basic	Heraeus Holding (D)
	–20° C Comfort	Liebherr (D)
Heißluftsterilisator	SNB 300	Memmert (D)
Hochgeschwindigkeits- kamera	Genie HM640	Teledyne Dalsa
Kühlraum	4° C	Genheimer (D)
Kühlschrank	MediLine	Liebherr (D)
Laborspülmaschine	G 7883 CD	Miele (D)
Magnetrührer	720-HPS	VWR (D)
Mikroplattenleser	Tecan Infinite M200	Tecan (D)
Mikrotom	SM2010 R	Leica Mikrosysteme (D)
Mikroskop	BZ-9000 BIOREVO	KEYENCE GmbH (D)
	Eclipse 80i	Nikon (D)
	JEOL TEM JEM2100	JEOL (USA)
	JEOL JSM-7500F	JEOL (USA)
Objektträger- beschriftungsgerät	VSP-5001	Vogel Medizintechnik (D)
Paraffineinbettstation	EG1150H	Leica (D)
Paraffinstreckbad	GFL1052	Gesellschaft für Labortechnik (D)
pH Meter	SevenEasy	Mettler Toledo (D)
Sterilwerkbänke		Thermo Fisher Scientific (D)
Stickstofftank	MV 815 P-190	Jutta Ohst german-cryo GmbH (D)
Trockenschrank	TDO66	Medite (D)
Vortex-Schüttler	Genie	Carl Roth (D)
Wärmeschrank		Medite GmbH (D)
Wasseraufbereitungs- system	Milli-Q	Merck Millipore (D)
Wasserbad	Lauda Alpha	Lauda (D)
Wippschüttler	KM-2 AKKU	Edmund Bühler GmbH (D)
Zentrifugen	Multifuge X12	Thermo Fisher Scientific (D)
	Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific (D)

3.8 Software

Tabelle 9: Übersicht der Software

Software	Zweck	Hersteller
BZ-II Analyzer	Programm für das Keyence Mikroskop	Keyence
ImageJ	Bildbearbeitungsprogramm	
MATLAB mit Analyse GUI	Programm zur Auswertung der Zilienschlagaktivität	MathWorks
Microsoft Excel 20	Tabellenkalkulation	Microsoft® (USA)
Microsoft PowerPoint	Zusammenstellung von Abbildungen	Microsoft® (USA)
Motion Traveller	Videoaufnahme	Teledyne DALSA
TeXmaker	Textverarbeitungsprogramm	MiKTEX 2.90
The UnscramblerX 10.3	Multivariate Datenanalyse	CAMO Software

4 Methoden

4.1 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturtechniken in dieser Dissertation erfolgten unter sterilen Bedingungen und der Benutzung einer Sicherheitswerkbank Klasse II. Zusätzlich wurden alle mehrfach verwendbaren Materialien vor Benutzung autoklaviert, um die Gefahr einer Kontamination zu verhindern. Das zu verwendende Medium sowie andere Zellkulturlösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen fand in Brutschränken statt, welche konstante Bedingungen von 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit gewährleisten.

4.1.1 Kultivierung von Primärzellen und Zelllinien

Primäre nasale und tracheobronchiale Epithelzellen wurden in *Airway Epithelial Cell Growth Medium* (AECG) und Fibroblasten in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Zellen von zwei CF-Patienten, die kommerziell erhältlich waren, wurden in firmeneigenem der Firma Epithelix Medium (hAEC) kultiviert. Die Atemwegszelllinien, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, waren HBEC3-KT, Calu-3, VA10 und Cl-huAEC (siehe Tabelle 1). HBEC3-KT wurden in definiertem Keratinozyten-SFM (K-SFM) Medium + Supplement und VA10 in AECG Medium kultiviert. Das Medium, das für die Calu-3 Zelllinie herangezogen wurde, war MEM und wurde mit 10 % FCS und 1 % Na-Pyruvat versetzt. Die Cl-huAEC Zelllinie wurde in speziellem Medium der Firma InSCREENex (huAEC Medium ready-to-use) kultiviert. Medienwechsel fand alle zwei bis drei Tage statt, die Zellen wurden kultiviert bis sie 80 - 90 % konfluent waren. In der 3D-Zellkultur wurden die Modelle einmal pro Woche apikal mit Medium gewaschen, um beispielsweise tote Zellen zu entfernen.

4.1.2 Zellisolation aus humanen Gewebeproben der oberen Atemwege

Zur Isolation von humanen respiratorischen Epithelzellen wurde das Transportmedium zunächst abgenommen und die Gewebeproben in frischem Medium (AECG) gewaschen, um Blutrückstände zu entfernen. Das Nasenschleimhautpräparat wurde in eine Petrischale überführt, Knorpel- und Knochenstücke entfernt und daraufhin in kleine Stücke geschnitten. Im Gegensatz zur nasalen Mukosa wurde bei dem tracheobronchialen Ge-

4 Methoden

webe lediglich das respiratorische Epithel abgezogen und dieses in kleine Stücke zerteilt. Im Anschluss wurden die Gewebestücke mit einigen Tropfen Medium (AECG) bedeckt und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde etwas Medium hinzugegeben, sodass die Gewebestücke noch Kontakt zur Kulturplatte hatten. Die Gewebestücke wurden am siebten Tag nach Zellisolation entfernt und zur Isolation der Fibroblasten weiterverwendet. Hierfür wurden die Gewebestücke in eine neue Petrischale überführt und dreimal in *PBS*⁺ gewaschen. Anschließend wurden sie in kleinere Stücke geschnitten, dann mit Hilfe von 5 ml Kollagenase in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert und die restlichen Stücke mit 5 ml Kollagenase in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Die Kollagenase wurde abgenommen, 10 ml Medium (DMEM + 10 % FCS) hinzugegeben und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Medium wurde abgezogen, die Stücke in frischem Medium resuspendiert und in eine Petrischale ausgesät. Die Fibroblasten wuchsen aus den Gewebestücken aus, die nach ca. sieben Tagen aus der Petrischale entfernt und entsorgt wurden.

4.1.3 Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen

Die Bürsten wurden zunächst im Transportmedium ausgeschüttelt und während des ersten Zentrifugationsschritts (1200 rpm, 5 min) im Reaktionsgefäß belassen. Danach wurden die Bürsten mit erneutem Ausschütteln aus dem Transportmedium entfernt und die Zellsuspension unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem AECG Medium + 1 % Anti-Anti resuspendiert und auf kommerziell erhältliche kollagen-beschichtete Zellkulturflaschen (CELLCOAT[®], Kollagen Typ 1, Art.-Nr.: 658950, greiner bio-one) ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert.

4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Da primäre Zellen lediglich in niedrigen Passagen verwendbar sind und in höheren Passagen das Proliferationsvermögen abnimmt, stellt das Einfrieren von Zellen eine Möglichkeit dar, um eine Zellbank für spätere Experimente zu erstellen.

Zum Einfrieren wurden die adhärensten Zellen zunächst von der Flasche nach Standardprotokoll (siehe 4.1.5) abgelöst und auf eine bestimmte Zellzahl/ml eingestellt. Zu dieser Zellsuspension, die in ein Cryoröhrchen transferiert wurde, wurden 10 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben. DMSO vermeidet intrazelluläre Zellschädigung während des Einfrier- und Auftauprozesses. Da das Reagenz bei Raumtemperatur (RT) zytotoxisch wirkt, war es von hoher Relevanz die Zellsuspension schnellstmöglich in einer

Einfrierhilfe (Mr. Frosty) bei -80°C zu platzieren. Die Einfrierhilfe gewährleistet ein langsames und gleichmäßiges Einfrieren und eine geringere Zellschädigung. Nach 24 Stunden wurde der Transfer in den Stickstofftank vorgenommen.

Zum Auftauen der Zellen wurde die eingefrorene Zellsuspension bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad erwärmt bis noch eine kleine Menge an Eis vorhanden war. Diese Zellsuspension wurde in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß, welches frisches und erwärmtes zellspezifisches Medium in einem Verhältnis von 1:10 enthielt, überführt. Nach anschließender Zentrifugation (1200 rpm, 5 min) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in eine neue Flasche ausgesät und das Medium nach einem Tag gewechselt, um die zellschädigende DMSO-Konzentration zu minimieren und um abgestorbene Zellen zu entfernen.

4.1.5 Passagieren von Zellen

Nach Erlangen einer Konfluenz von 70 - 90 %, werden Zellen passagiert, um die Proliferation beizubehalten. Zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde zunächst das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit *PBS*⁻ gewaschen, um Relikte des Serums zu entfernen, welches die Enzymreaktion während des Ablöseprozess inhibieren könnte. Anschließend wurde je nach Zellkulturflaschengröße frisches *PBS*⁻/EDTA hinzugegeben (T25: 4 ml, T50: 8 ml, T150: 16 ml) und für 10 Minuten im Inkubator bei 37°C preinkubiert. Lassen sich die Zellen schwer ablösen, so kann dieser Schritt auf bis zu 30 min verlängert werden. Makroskopisch konnte überprüft werden, ob sich die Zellen bereits abgelöst hatten, welches durch leichtes Klopfen an die Flasche unterstützt werden konnte. Falls die adhärenen Zellen nach diesem Schritt komplett abgelöst waren, wurden diese umgehend in ein Reaktionsgefäß transferiert und es wurde mit der Zentrifugation fortgefahren. Andernfalls wurde Trypsin, das die Proteine spaltet, die für die Adhärenz der Zellen verantwortlich sind, in einem Verhältnis von 1:10 hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 - 5 Minuten bei 37°C wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob sich alle Zellen abgelöst haben. Falls einige Zellen noch nicht abgelöst waren, wurde dies ebenfalls durch sanftes Klopfen an die Flasche unterstützt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 10 % FCS gestoppt und die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um zu garantieren, dass sich alle Zellen nun im Reaktionsgefäß befinden, wurde die Flasche erneut mit *PBS*⁻/EDTA gewaschen und diese Lösung in das gleiche Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurde bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in frischem zellspezifischem Medium resuspendiert und in entsprechender Zellzahl ausgesät. Zur Bestimmung

der Zellzahl wurde wie nachfolgend beschrieben fortgeföhren (siehe 4.1.6). Die Zahl der Passage erhöht sich nach jedem Passagierschritt.

4.1.6 Determinierung der Zellzahl und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl sowie die Zellebendzahl wurden mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung bestimmt. Nach dem Ablösen sowie der Zentrifugation der Zellen (siehe 4.1.5), wurde eine 1:1 Mischung der Zellsuspension und einer 0,4 % Trypanblau-Lösung hergestellt (Verdünnungsfaktor $f_{\text{Verdünnung}}=2$) und ca. 20 μl davon in die Neubauer-Zählkammer überführt. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop weiß, da das Trypanblau über die intakte Zellmembran nicht eindringen kann. Tote Zellen werden aus diesem Grund blau sichtbar. Die folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl der lebenden Zellen:

$$N = \sum \frac{\text{Zellen}}{\text{gezählteQuadranten}} \cdot V \cdot f_{\text{Verdünnung}} \cdot f_{\text{Kammer}} \quad (1)$$

N steht hierbei für die Anzahl der lebenden Zellen, V steht für das Volumen, in dem die Zellen resuspendiert werden. Der Verdünnungsfaktor errechnet sich aus dem Verhältnis Trypanblau zu Zellsuspension und der Kammerfaktor f_{Kammer} beträgt 10.000.

Die Vitalität ist das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl ausgedrückt in Prozent:

$$\text{Vitalität}[\%] = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100\% \quad (2)$$

4.2 Herstellung der biologischen Matrix SISser

Einige der 3D-Atemwegstestsysteme wurden auf Basis eines dezellularisierten Segments des Jejunums aus dem Schwein, im speziellen SISser (*Small Intestine Submucosa* mit SERosa) aufgebaut. Für die Herstellung der biologischen Matrix wurde ein Teil oder der gesamte Dünndarmabschnitt von 8 - 11 Wochen alten und 17 - 20 kg schweren Hausschweinen entnommen. Dies wurde am Zentrum für Molekulare Medizin (ZEMM, Würzburg) durchgeführt. Die Schweine wurden gemäß dem von den *National Institutes of Health* herausgegebenen *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publikationsnr. 85-23, revidiert 1996) gehalten.

4 Methoden

Die Schweine wurden zunächst betäubt, heparinisiert und durch eine Überdosis Anästhetikum getötet. Nach der Explantation und dem Transport bzw. der Lagerung in *PBS*⁻ + 1 % Gentamicin bei 4°C erfolgte die Dezellularisierung am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin. Das Protokoll zur Durchführung wurde basierend auf bereits publizierten Protokollen durchgeführt [148, 149].

Die Darmstücke wurden mit VE (vollentsalztem)-Wasser durchgespült, bis das herausfließende Wasser annähernd klar war. Anschließend wurden die Darmstücke in ca. 10 - 15 cm lange Abschnitte gekürzt, welche auf links gedreht wurden, sodass die Innenseite nach Außen zeigte. Diese Stücke wurden auf 25 ml Pipetten aufgezogen und die oberste Schicht der Mukosa durch mechanisches Abschaben entfernt. Danach wurden die Darmstücke in *PBS*⁻ überführt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler gelagert. Die Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, bei 4°C auf dem Wippschüttler. Am nächsten Tag wurden die Stücke zunächst drei Mal in frischem *PBS*⁻ gewaschen und anschließend an einer Seite mit einer Klemme verschlossen und mit Natriumdesoxycholat-Lösung gefüllt und für 1,5 Stunden in dieser Lösung inkubiert. Daraufhin wurde die Natriumdesoxycholat-Lösung durch *PBS*⁻ ersetzt und die Stücke wurden erneut für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Darmstücke an beiden Seiten abgeschnitten und über mehrere Stunden in *PBS*⁻ + 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen und anschließend über Nacht geschüttelt. Am zweiten Tag nach der OP fand die Inkubation in DNase bei 37°C für zwei Stunden auf dem Schüttler statt. Die Darmstücke wurden über den Tag verteilt drei Mal in *PBS*⁻ gewaschen. Anschließend fand die Gamma-Sterilisation statt, welche durch den BBF Sterilisationsservice GmbH durchgeführt wurde.

Anschließend wurde die Qualitätskontrolle der dezellulierten Jejunum-Segmente durch die technischen Assistenten am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin durchgeführt. Diese beinhaltete eine histologische Analyse mittels HE-Färbung und eine DNA-Färbung nach Feulgen. Ein Gallsäuretest bestätigte das komplette Herauswaschen des Natriumdesoxycholats.

4.3 Aufbau und Kultivierung von 3D *in vitro* Atemwegstestsystemen

Für die 3D-Zellkultur wurden nasale Primärmodelle basierend auf der biologischen Matrix SISser (Im Nachfolgenden nur SIS) entsprechend *Schweinlin et al.* [121] sowie 3D-Gewebemodelle auf Polyethylenterephthalat (PET)-Membran aufgebaut (SIS: vier Donoren, PET-Membran: zwei Donoren). Tracheobronchiale Primärmodelle wurden ebenfalls auf der SIS aufgebaut, wohingegen kommerziell erhältliche bronchiale 3D-Modelle auf PET-Membran (MucilAirTM) der Firma Epithelix herangezogen wurden (SIS: drei

Donoren, MucilAirTM: drei Donoren). Zudem fand die Generierung von Krankheitsmodelle statt. PCD-Modelle (drei Donoren) basierten auf der SIS, wohingegen CF-Modelle entweder auf PET-Membranen mit CF-Zellen der Firma Epithelix (gleiche Spender wie MucilAirTM) aufgebaut wurden oder von der Firma Epithelix herangezogen wurden (PET-Membran: 2 Donoren, MucilAirTM: 2 Donoren). Die Modelle der Atemwegsepithelzelllinien Calu-3 (n=4), VA10 (n=4) und Cl-huAEC (n=4) basierten ausschließlich auf der biologischen Matrix SIS, wohingegen HBEC3-KT Modelle sowohl auf der SIS (n=3) als auch auf PET-Membran (n=4) aufgebaut wurden.

4.3.1 Aufbau von 3D-Atemwegstestsystemen

Für Primärmodelle auf der SIS wurden humane respiratorische Fibroblasten und Epithelzellen (nasal und tracheobronchial) auf die luminale Seite der SIS ausgesät. Zur Besiedlung der PET-Membran wurden zunächst Fibroblasten auf die Unterseite und darauffolgend die Epithelzellen auf die Oberseite ausgesät.

Für Atemwegstestsysteme auf der biologischen Matrix wurde wie folgt vorgegangen. Das Einspannen der SIS in eine Zellkrone ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Serosa wurde zuerst von der SIS abgezogen und anschließend in die sogenannte Zellkrone eingespannt. Die Zellkrone besteht aus zwei ineinander passenden Metallringen, wobei der Größere kleine Standfüße besitzt, sodass die Matrix nicht die Zellkulturplatte berührte und Medienfluss unterhalb des Modells gewährleistet wurde. Zuerst wurde ein Stück SIS in eine Petrischale überführt, wo sie der langen Seite nach aufgeschnitten wurde (Abb. 5A, B). Die Matrix wurde aufgeklappt (Abb. 5C, D), die Serosa abgezogen und entfernt (Abb. 5E). Anschließend folgte das Zerschneiden in passende Stücke zum Bespannen der Zellkrone (Abb. 5F, G). Dieses wurde nun über den inneren Ring der Zellkrone gestülpt, sodass die luminale Seite in das Innere der Zellkrone zeigte (Abb. 5H, I). Der äußere Ring wurde darübergestülpt, damit die Matrix fest zwischen beiden Ringen aufgespannt war (Abb. 5J) und die komplette Zellkrone umgedreht (Abb. 5K). Sie wurde in eine 6- oder 12-Well Platte transferiert (Abb. 5L) und mit Fibroblastenmedium bedeckt.

Für Atemwegsmodelle auf PET-Membran wurde das Insert verkehrt herum in 6-Well Platten platziert und die Oberfläche mit Fibroblastenmedium benetzt. Bei beiden Versuchsaufbauten fand eine Inkubationszeit des Fibroblastenmediums von ca. zwei Stunden bei 37°C statt, damit die Matrix das Medium aufnehmen konnte. Humane Atemwegsfibroblasten wurden in einer Zelldichte von $5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ je Zellkrone bzw. $4,4 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ je Insert in 500 μl Medium besiedelt (Tag -2).

4 Methoden

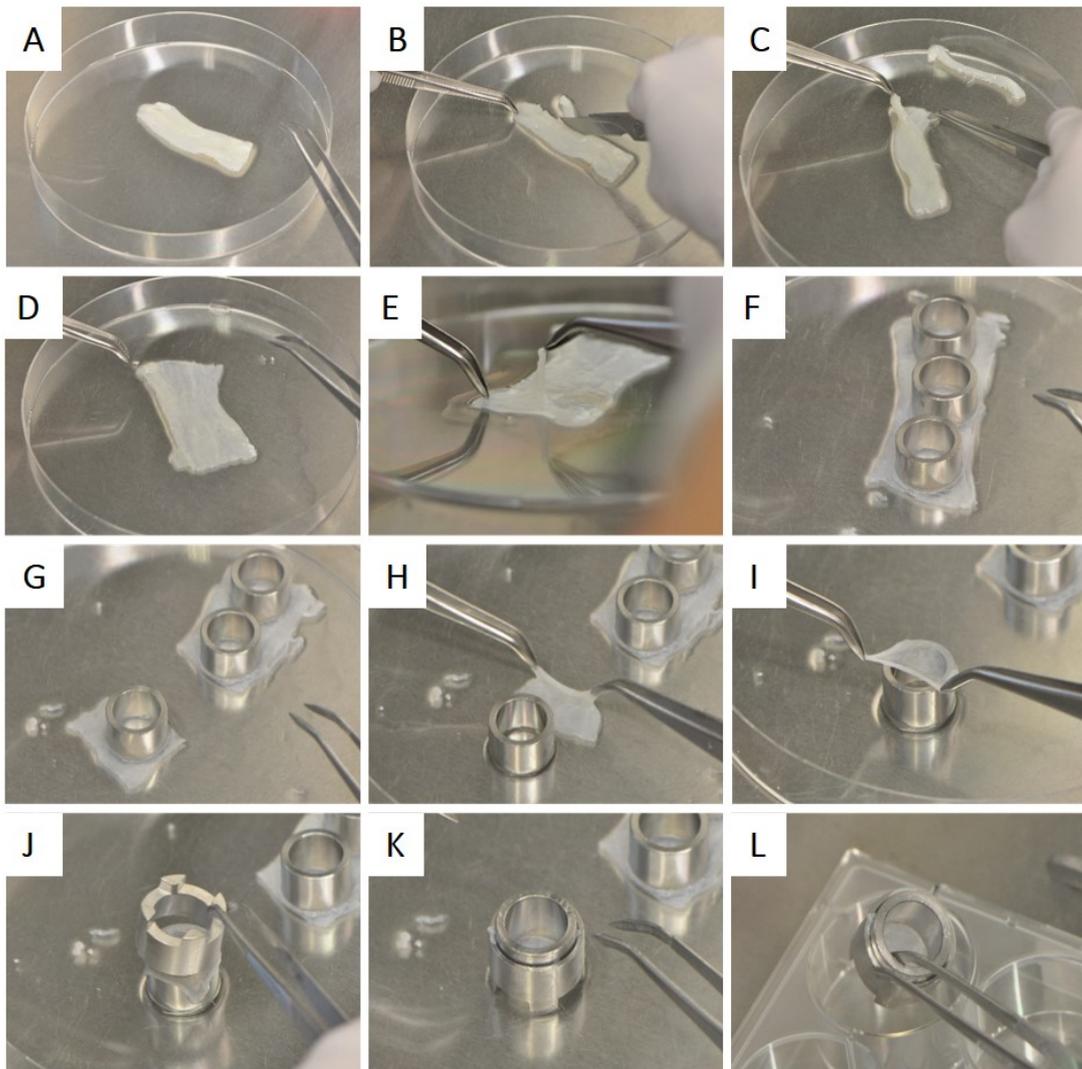


Abbildung 5: Bespannen einer Zellkrone mit der biologischen Matrix SIS. Ein Stück des dezellularisierten Schweinedarms SIS wurde in einer Petrischale platziert (A), der Länge nach aufgeschnitten (B) und aufgeklappt (C, D). Anschließend wurde die Serosa entfernt (E) und der innere Zylinder der Zellkrone darauf platziert (F). Die SIS wurde in passende kleinere Stücke geschnitten (G) und auf den inneren Ring mit luminaler Seite nach unten gestülpt (H, I). Der äußere Ring wurde darüber platziert, um eine Straffung der Matrix zu garantieren (J). Die Zellkrone wurde umgedreht und in eine 6- oder 12-Well-Platte transferiert (K, L).

Für die Besiedlung der PET-Membran mit Fibroblasten wurde das Insert verkehrt herum in der 6-Well-Platte inkubiert bis die Besiedlung mit Epithelzellen stattfand. An Tag -1 wurde die Zellkrone mit $2,5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ bzw. das Insert mit $2,2 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ Atemwegsepithelzellen in einem Volumen von $500 \mu\text{l}$ besiedelt. Hierfür wurden das Insert wieder gedreht und in 12-Well-Platten überführt. Die Zellsuspension der Epithelzellen wurde

apikal in die Zellkrone pipettiert. Es wurde 2 ml Ko-Kultur Medium, das sich aus 1:1 Fibroblasten-Medium und Atemwegsepithelzell-Medium zusammensetzt, basal hinzugegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C wurde an Tag 1 das apikale Medium entfernt und die Modelle für mindestens 21 Tage unter *Airlift*-Bedingungen kultiviert.

4.3.2 Kultivierung der Atemwegsmodelle MucilAir™(Epithelix)

Im Rahmen dieser Dissertation wurden neben den selbst aufgebauten Atemwegstestsystemen ebenfalls kommerziell erhältliche tracheobronchiale 3D-Atemwegsmodelle von Epithelix von zwei CF-Patienten (zwei weibliche Spender, 24 - 25 Jahre) und von drei gesunden Probanden (ein weiblicher, zwei männliche Spender, 15 - 66 Jahre) herangezogen. Die leeren 12-Well Platten wurden nach Lieferung mit 0,7 ml vorgewärmten zellspezifischem Medium der Firma Epithelix aufgefüllt und die Inserts mit einer Pinzette in diese transferiert. Die Modelle wurden für mindestens 21 Tage unter *Airlift*- und Standardbedingungen kultiviert.

4.4 Substanzapplikation mittels Vitrocell® Cloud Aerosolgenerator

Um den Einfluss von 0,9 % NaCl-Lösung sowie Salbutamol (1,5 mg Salbutamolsulfat, mit Konservierungsmittel) auf die Zilienschlagfrequenz zu untersuchen, wurden diese als Flüssigaerosol mittels Aerosolgenerator Vitrocell® auf nasale (zwei Donoren) und tracheobronchiale (drei Donoren) 3D-Gewebemodelle appliziert.

Der untere Teil des Aerosolgenerators wurde mit ca. 6 ml/3 Wells Zell-spezifischem Medium gefüllt und konnte auf 37°C geheizt werden. Die Zellkronen, in welchen die Modelle kultiviert wurden, wurden mittels passendem Adapter in die jeweiligen Vertiefungen der Vitrocell® Cloud transferiert und eine Abdeckung aus Plexiglas wurde darauf platziert, um eine dosisgesteuerte und räumlich gleichmäßige Ablagerung zu gewährleisten. An diese Haube wurde oben der sogenannte Vernebler angeschlossen, in welchen 100 µl 0,9 % NaCl- bzw. Salbutamol-Lösung pipettiert wurde. Das Volumen wurde in 3 - 4 Minuten zerstäubt und sank gleichmäßig auf die Modelle ab. Die Porengröße des Verneblers betrug 4 - 6 µm.

4.5 Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie

Zur Qualitätskontrolle der 3D-Atemwegsmodelle wurde nach einer Mindestkulturdauer von 21 Tagen mikroskopisch auf das Vorhandensein funktionaler Kinozilien geprüft. Bei präsenten funktionalen Kinozilien fand die Aufnahme von kurzen Videoabschnitten statt. Während der Aufnahme einer Videosequenz war es wichtig, eine konstante Temperatur

von 37°C zu gewährleisten, da der Zilienschlag temperaturabhängig ist [150]. Das hierfür notwendige System von Biotech (Delta T-Dish System) gewährleistet eine präzise Temperaturkontrolle in der Kulturschale während der gesamten Messung. Das System besteht aus einer Kontrolleinheit, einem Tischadapter und den entsprechenden Kulturschalen (Delta T-Dish). Bestehend aus Polystyrol und Desag-263-Glas, messen sie 6 mm hoch und haben einen Außendurchmesser von 35 mm sowie einen durchsichtigen Glasboden mit einem Durchmesser von 23 mm. Diese wurden vorab mit Sylgard-Polymer beschichtet, um das Aufspannen der Modelle zu garantieren.

Die Modelle wurden vor dem Versuchsaufbau apikal mit zellspezifischem Medium gewaschen und anschließend in einer Delta T-Dish aufgespannt. Das aufgespannte Modell wurde mit 2 ml epithelzellspezifischem Medium bedeckt und unter dem Tauchobjektiv (Zilienschlagfrequenz: 40 x, Partikeltransport: 20 x) platziert.

4.5.1 Zilienschlagfrequenzanalyse

Zur Zilienschlagfrequenzanalyse wurden die 3D-Atemwegsmodelle in einer Delta T-Dish aufgespannt. Zur Verifizierung einer konstanten Frequenz während des gesamten Versuchs wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 10 Minuten (0 min, 10 min, 20 min, 30 min) ein Video unter Benutzung eines 40 x Tauchobjektivs aufgenommen. Die Videos bestanden aus 1.000 Bildern (640 x 480 Pixel) und die Aufnahmezeit betrug 100 Bilder/s. Die Analyse wurde mittels Fast-Fourier-Transformation innerhalb eines *graphical user interface* (GUI) in MATLAB, welches von Prof. Dr. med. Peter König (Universität Lübeck, Deutschland) programmiert und zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Das zu analysierende Video wurde innerhalb des *Frequency Analysis GUI* in die Software geladen. Zur Erstellung einer *heat map*, welche zur farblichen Visualisierung der Frequenz diente und somit einen intuitiven und schnellen Überblick gab, wurden 100 Bilder geladen. Zur Auswertung der Zilienschlagfrequenz wurden 1.000 Bilder in die Software geladen und pro Video wurden zehn Zellen mit Hilfe einer *region of interest* (ROI) ausgewählt und anschließend die Frequenz ermittelt.

4.5.2 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Zilienschlagfrequenzanalyse wurde der *Student's T-Test* (zweiseitig) mit dem arithmetischen Mittel der ROI aus mindestens $n=2$ (siehe Abbildungsunterschriften) einzelnen Experimenten mit Microsoft Excel 2013 durchgeführt. Für $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant definiert. Alle statistischen Analysen wur-

den mit Hilfe von Dr. Sarah Nietzer am Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin in Würzburg realisiert.

4.5.3 Analyse der mukoziliären Transportgeschwindigkeit

Die Proben wurden analog zur CBF-Analyse vorbereitet. Zu den 2 ml zellspezifischem Medium wurden 2 μ l DynabeadsTM gegeben und vor Aufnahme eines Videos durch auf- und abpipettieren durchmischt. Die Aufnahmen fanden mittels 20 x Tauchobjektiv statt. Ein Video bestand aus 3.000 Bildern (640 x 480 Pixel) während die Aufnahmezeit auf 200 Bilder pro Sekunde festgesetzt wurde. Die Analyse der mukoziliären Transportgeschwindigkeit wurde mittels Image Pro Premier Software und wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Das zu analysierende Video wurde in Image Pro Premier geladen und das bereits in der Software kalibrierte Objektiv ausgewählt. Anschließend wurde mittels des *object tracking* Werkzeugs manuell die zurückgelegte Strecke der Partikel verfolgt und die so erhaltenen Daten in ein der Software zugehöriges Makro geladen, welches die Transportgeschwindigkeit errechnete.

4.6 Histologische Charakterisierung und Immunfluoreszenzfärbung

4.6.1 Fixieren von Zellen und Gewebe

Zur Charakterisierung der Epithelzellen oder Zelltypen im 3D-Modell mussten die Zellen bzw. das Gewebe fixiert werden. Zellen auf Glasplättchen wurden vor dem Fixieren mit *PBS*⁻ gewaschen und anschließend für 10 Minuten in phosphatgepufferter Formaldehydlösung 4 % (PFA, Roti-Histofix, pH 7) bei Raumtemperatur inkubiert. Es bestand die Möglichkeit diese bis zum Färben bei 4°C in *PBS*⁻ zu lagern. Die Gewebemodelle wurden ebenfalls mit *PBS*⁻ gewaschen. Daraufhin wurde die Zellkrone apikal sowie basal für zwei Stunden in PFA bei Raumtemperatur inkubiert.

4.6.2 Paraffineinbettung und Mikrotomschnitte

Die fixierten Modelle wurden aus der Zellkrone genommen und die zellfreien Ränder mittels Skalpell entfernt. Sie wurden in eine mit Filterpapier ausgelegte Einbettkassette überführt, welche bis zum Einbettprozess in Leitungswasser lagerte. Die Paraffineinbettung erfolgte automatisch mit Hilfe eines Einbettautomaten gemäß des in Tabelle 10 aufgeführten Protokolls statt.

4 Methoden

Nach Abschluss des Programms wurden die Modelle aus der Kassette und dem Filterpapier entnommen und an der Paraffineinbettstation je nach Größe in zwei oder drei Teile geschnitten. Diese wurden mit der Schnittkante nach unten in einer Metallschale, welche mit flüssigem Paraffin gefüllt war, positioniert und anschließend auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Anschließend konnten die vorgekühlten Blöcke am Mikrotom in 3 - 5 μm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgezogen werden. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Objektträger, die mit Poly-L-Lysin beschichtet sind, herangezogen, für HE-Färbungen wurden die Schnitte auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen. Beim Aufziehen der Schnitte war zu beachten, dass diese mit Hilfe eines 60°C warmen Wasserbads gestrafft wurden und anschließend mit in 70 % EtOH getränktem Filterpapier festgedrückt wurden. Die Schnitte trockneten bei 37°C über Nacht.

Tabelle 10: Programm zur Paraffineinbettung

Schritt	Lösung	Zeit [h]
Auswaschen der Fixierlösung	VE Wasser	1
Aufsteigende Alkoholreihe	EtOH 50 %	1
zum Entwässern	EtOH 70 %	1
	EtOH 80 %	1
	EtOH 96 %	1
	Isopropanol I	1
	Isopropanol II	1
Entfernen des Alkohols	Isopropanol / Xylol (1:2)	1
	Xylol I	1
	Xylol II	1
Paraffinieren	Paraffin I	1,5
	Paraffin II	1,5

4.6.3 Entparaffinieren und Rehydrieren

Die Schnitte wurden vor jeder Färbung zunächst entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 11). Die Schnitte inkubierten für eine Stunde bei 60°C, um das Paraffin zu schmelzen. Anschließend wurden die Schnitte sofort in Xylol überführt und das Entparaffinieren und Rehydrieren fand gemäß Tabelle 11 statt.

4 Methoden

Tabelle 11: Protokoll zum Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte

Schritt	Lösung	Zeit [min]
Entparaffinieren	Xylol I	10
	Xylol II	10
Rehydrieren	EtOH 96 %	3x eintauchen
	EtOH 96 %	3x eintauchen
	EtOH 70 %	3x eintauchen
	EtOH 50 %	3x eintauchen
	VE Wasser	Schwenken, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind

4.6.4 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Bei der Hämatoxylin und Eosin (HE)-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung. Wobei Hämatoxylin basophile Strukturen wie z.B. DNA oder Zellkerne blau färbt und Eosin acidophile Strukturen wie z.B. Proteine des Zytoplasmas rot anfärbt. Nach Entparaffinieren und Rehydrieren (siehe Tabelle 11) fand die HE-Färbung gemäß Tabelle 12 statt.

Tabelle 12: Protokoll zur HE-Färbung

Schritt	Lösung	Zeit [min]
Färben der basophilen Strukturen	Hämatoxylin	6
Spülen	VE Wasser	
Bläuen	Leitungswasser	5
Färben der acidophilen Strukturen	Eosin	6
Spülen	VE Wasser	
Entwässern	EtOH 50 %	3x eintauchen
	EtOH 70 %	2
	Isopropanol I	5
	Isopropanol II	5
	Xylol I	5
	Xylol II	5

Alternativ zur aufsteigenden Alkoholreihe konnten die Schnitte luftgetrocknet werden und vor dem Eindecken für fünf Minuten in Xylol inkubiert werden. Die Schnitte wurden in Entellan eingedeckt.

4.6.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zellen auf Glassplättchen wurden zunächst für fünf Minuten mit 0,2 % Triton-X100 inkubiert, um die Zellen permeabel zu machen und intrazelluläre Antigene detektieren zu können. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in Waschpuffer für 5 min bei RT.

Die Schnitte mussten vor der Immunfluoreszenzfärbung gemäß Tabelle 11 entparaffiniert und rehydriert werden. Es folgte eine hitzeinduzierte Demaskierung der Epitope, indem die Schnitte in entsprechendem Puffer (pH 6 oder 9, siehe Tabelle 2) für 20 Minuten gekocht wurden. Die Schnitte wurden in VE-Wasser überführt, mit Fettstift umrandet und daraufhin in Waschpuffer umgesetzt. Das Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung ist in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 13: Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung

Schritt	Reagenz/Lösung	Zeit/Bedingungen
Blocken	5 % BSA	30 min
Primärantikörper	Antikörper in Antikörperverdünnungs- lösung Verdünnung siehe Tabelle 2	über Nacht bei 4°C
Waschen	Waschpuffer	3x 5 min
Sekundärantikörper	Antikörper in Antikörperverdünnungs- lösung Verdünnung siehe Tabelle 2	60 min bei RT
Waschen	Waschpuffer	3x 5 min
Eindecken	Fluoromount G + DAPI	

Als Negativkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers Antikörperverdünnungslösung eingesetzt. Die Kontrolle diente zum Ausschließen unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper. Für eine Doppelfärbung wurden Primärantikörper aus verschiedenen Spezies herangezogen. Die Inkubation des Sekundärantikörpers sowie alle darauffolgenden Schritte erfolgten lichtgeschützt.

4.7 Ultrastrukturelle Analyse

Die 3D-Gewebemodelle wurden nach 21 Tagen *Airlift*-Kultur mit PBS^- gewaschen und aus der Zellkrone entnommen. Für die anschließende Fixierung und Aufarbeitung wurde mit einem ca. 4 mm² Stück, das aus der Mitte des Modells entnommen wurde, fortgefahren. Die ultrastrukturelle Analyse der 3D-Gewebemodelle mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie die Probenaufbereitung fand nach einem zuvor veröffentlichten Protokoll [151] an der zentralen Abteilung für Mikroskopie von Prof. Dr. Christian Stigloher (Abteilung für Elektronenmikroskopie, Biozentrum der Universität Würzburg) statt.

Die Proben wurden zuerst in 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend in 2 % OsO₄ fixiert, mit H₂O gewaschen und in 0,5 % Uranylacetat inkubiert. Anschließend wurden die Proben dehydriert, mittels EMBED-812-Kit eingebettet, ultradünn geschnitten und anschließend mit dem JEOL TEM JEM2100 bzw. dem JEOL JSM-7500F analysiert. Insgesamt wurden zur Charakterisierung der Primärmodelle bzw. der Zelllinien HBEC3-KT, Calu-3 und Cl-huAEC mittels TEM drei unabhängige Experimente bzw. für die Zelllinie VA10 und je PCD-Donor ein Experiment durchgeführt. Zur Analyse der Modelloberfläche zweier CF-Donoren mittels REM wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

4.8 Raman-Spektroskopie und multivariate Datenanalyse

Bei der Raman-Spektroskopie handelt es sich um eine nicht-invasive, markierungsfreie Technik, die die Schwingungsmodi von Molekülen untersucht, wodurch sie biochemische Informationen über biologische Systeme liefert [152]. Zur Identifizierung eines möglichen Biomarkers für die CF und die PCD wurden die jeweiligen Epithelzellen und Epithelzellen nicht CF- oder PCD-Erkrankter als Kontrolle in 2D mittels Raman-Spektroskopie analysiert. Insgesamt wurden die Zellen von zwei CF- und vier Kontrollspendern in fünf voneinander unabhängigen Experimenten gemessen, wohingegen die Zellen von einem PCD- und von zwei Kontrollspendern in drei voneinander unabhängigen Experimenten untersucht wurden. Die Messung der Zellen fand mit dem BioRam[®]-System der Firma CellTool GmbH statt. Einzelne Zellen befanden sich in Vertiefungen (sog. Microwells) mit einem Durchmesser von 25 μm . Die Microwells wurden von Herrn Prof. Dr. Rädler der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt, wo sie auf der Grundlage eines zuvor veröffentlichten Protokolls hergestellt wurden [153]. Der Kanal, der mehrere Microwells zugänglich macht, wurde am Tag vor der Messung drei Mal mit je 100 μl Ethanol 70 % und anschließend drei Mal mit je 100 μl zellspezifischem Medium ge-

4 Methoden

spült, wobei sich am Ende 100 μl Medium im Kanal befanden. Die gesamte Messkammer wurde über Nacht bei 4°C gelagert und vor dem Ablösen der Zellen auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden zunächst gemäß Kapitel 4.1.5 von der Flasche abgelöst und auf eine Zellzahl von 300.000/300 μl eingestellt. Der Kanal der Messkammer wurde 3 mal mit je 100 μl der Zellsuspension durchgespült und für ca. 20 min bei 37°C inkubiert, damit die Zellen in die Microwells absinken konnten.

Die Kalibrierung des BioRam[®]-Systems musste mit Hilfe eines Siliziumplättchens auf die charakteristische Wellenzahl des Siliziums (520 cm^{-1}) überprüft werden. Dies erfolgte mittels 60 x Objektiv und einer Aufnahmezeit von 10 x 1 s. Zur Probenmessung wurde ein 60 x Wasserimmersionsobjektiv herangezogen, wobei eine akkumulierte Aufnahmezeit von 3 x 10 s je Probe eingestellt wurde. Pro Probe wurden 50 - 100 Messungen veranschlagt, die aufgrund niedriger Zellzahlen oder einer geringen Vitalität jedoch nicht für jede Probe erfüllt werden konnten. Für zwei CF-Patienten und deren Kontrollen wurden 585 und 360 Messungen an fünf Versuchstagen durchgeführt. Für Epithelzellen von einem PCD-Spender bzw. der Kontrollen wurden 140 und 199 Messungen an jeweils drei Tagen durchgeführt.

Zunächst wurden die Mittelwertspektren der jeweiligen Patienten- und Kontrollzellen erstellt, um direkt auf mögliche Unterschiede schließen zu können. Die multivariate Datenanalyse der spektroskopischen Raman-Daten fand anschließend mit Hilfe der Software The UnscramblerX 10.3 statt. Der biologisch relevante Bereich der Spektren wird im Wellenzahlbereich 507 - 1694 cm^{-1} [154] erwartet. In diesem Ansatz wurde der Wellenzahlbereich auf 600 - 1801 cm^{-1} zugeschnitten. Um das Hintergrundrauschen zu reduzieren, wurden die Datensätze mit einem Medianfilter vorbehandelt und anschließend mittels der Vektor-1-Normalisierung normalisiert. Mittels der Hauptkomponentenanalyse (PCA, *engl. principal component analysis*), wurden die komplexen Datensätze reduziert und veranschaulicht. Hierbei wurden die Datensätze mittenzentriert, der NIPALS-Algorithmus sowie die Leverage-Korrektur wurden angewendet und es wurden die ersten sieben Hauptkomponenten analysiert. Die Lineare Diskriminantenanalyse (LDA) wurde anschließend unter Verwendung der ersten und zweiten Hauptkomponentenwerte als Variable durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Aufbau und Charakterisierung von humanen 3D-Atemwegstestsystemen

Die 3D-Atemwegsgewebemodelle wurden auf Grundlage von zwei verschiedenen Matrices aufgebaut. Primäre nasale sowie tracheobronchiale Epithelzellen wurden sowohl auf der biologischen Matrix SIS, als auch auf der synthetischen Matrix PET kultiviert, wobei es sich bei den tracheobronchialen Modellen auf der PET-Membran um das kommerziell erhältliche MucilAirTM der Firma Epithelix handelt. Neben primären respiratorischen Epithelzellen wurden ebenfalls vier verschiedene Atemwegsepithelzelllinien (HBEC3-KT, Calu-3, VA10 und Cl-huAEC) auf der SIS ausgesät, wobei HBEC3-KT ebenfalls auf der PET-Membran kultiviert wurde. Die 3D-Gewebemodelle wurden histomorphologisch untersucht und deren Ultrastruktur aufgeklärt. Spezifische Marker wurden mittels Immunfluoreszenz in 2D und 3D analysiert. Anschließend fand die qualitative Analyse des Zilienschlags der primären 3D-Gewebemodelle basierend auf der SIS und der PET-Membran sowie der HBEC3-KT-Zelllinie basierend auf der SIS statt. Des Weiteren wurde die Zilienschlagfrequenz in Primärmodellen quantifiziert sowie der Einfluss der Substanzen Salbutamol und isotoner Kochsalzlösung auf die Zilienschlagfrequenz untersucht. Abschließend fand die Untersuchung des mukoziliären Transports statt.

5.1.1 Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen

Zum Aufbau von 3D-Gewebemodellen der humanen respiratorischen Mukosa wurden Epithelzellen sowie Fibroblasten herangezogen. Diese wurden aus humanen Schleimhautresektaten isoliert. Im Rahmen dieser Dissertation wurde am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin ein Protokoll zur Isolation humaner nasaler Epithelzellen aus nasalen Schleimhautabstrichen etabliert (siehe 4.1.3 und SOP im Anhang), um eine neue Zellquelle zu schaffen, die es ermöglicht nasale Epithelzellen von Kindern und Erwachsenen, gesund oder krank, zu gewinnen. Der epitheliale Charakter der mit Hilfe eines nasalen Schleimhautabstrichs gewonnenen Zellen, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Epithelzellen zeigen eine CK14-Expression im Zytoplasma (siehe Abbildung 6B), wodurch deren epithelialer Charakter verifiziert wurde.

5.1.2 Der epitheliale Charakter von respiratorischen Epithelzellen in 2D

Zur Verifizierung des epithelialen Charakters wurden humane Atemwegsepithelzellen, welche entweder aus nasalen Gewebebiopsien oder Schleimhautabstrichen isoliert wurden, sowie die Epithelzelllinien HBEC3-KT, Calu-3, VA10 und Cl-huAEC in 2D mittels Immunfluoreszenzfärbung des epithelialen Markers anti-CK14 charakterisiert (Abbildung 6). Die Primärzellen (Abb. 6A, B), als auch HBEC3-KT (Abb. 6C) und VA10 (Abb. 6E) zeigen ein positives Signal im Zytoplasma, wohingegen Calu-3 (Abb. 6D) und Cl-huAEC (Abb. 6F) kein CK14 exprimieren. Die höhere Zellzahl von HBEC3-KT lässt sich auf deren Kultivierungsdauer zurückführen, wohingegen die hohe Zelldichte der Calu-3 Zellen auf deren Inselbildung in 2D zurückzuführen ist.

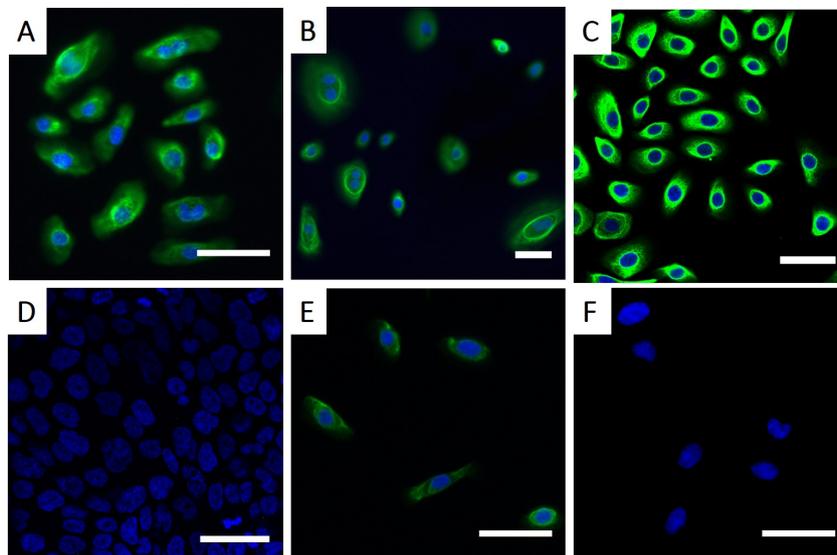


Abbildung 6: Epitheliale Charakterisierung von Atemwegsepithelzellen in 2D mittels CK14 Färbung. Primäre nasale Atemwegsepithelzellen (Gewebebiopsie: A, nasaler Schleimhautabstrich: B) sowie HBEC3-KT (C) und VA10 (E) exprimieren CK14 im Zytoplasma. Calu-3 (D) und Cl-huAEC (F) zeigen keine CK14-Expression. n=5 (Gewebebiopsie), n=2 (nasaler Schleimhautabstrich), n=4 (HBEC3-KT), n=3 (Calu-3, Cl-huAEC), n=1 (VA10). Maßstab: 50 μm .

5.1.3 Histomorphologische Charakterisierung von Atemwegstestsystemen

Im Zuge dieser Arbeit wurden 3D-Gewebemodelle der humanen respiratorischen Mukosa basierend auf unterschiedlichen Zellquellen aufgebaut. Neben Primärzellen der humanen nasalen sowie tracheobronchialen Mukosa, wurden die Atemwegsepithelzelllinien HBEC3-KT, Calu-3, VA10 sowie Cl-huAEC in Ko-Kultur mit humanen respiratorischen Fibroblas-

5 Ergebnisse

ten zum Aufbau verwendet. Als Trägerstruktur diente die biologische Matrix SIS. Um den Einfluss der Trägerstruktur auf die Differenzierung der nasalen Primärzellen und HBEC3-KT im Hinblick auf zilienträgende Zellen zu untersuchen, wurden nasale Epithelzellen und HBEC3-KT auf der PET-Membran kultiviert und MucilAirTM als tracheobronchiale Modelle auf der PET-Membran herangezogen.

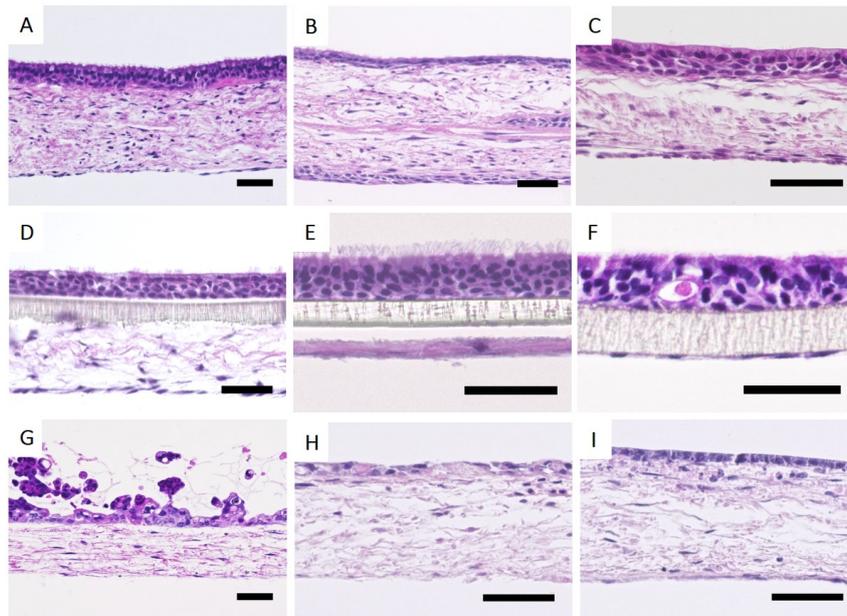


Abbildung 7: HE-Färbung von Atemwegstestsystemen basierend auf unterschiedlichen Zellquellen und Matrices in Ko-Kultur mit respiratorischen Fibroblasten. Primäre nasale Epithelzellen auf der SIS (A) und der PET-Membran (D) zeigen ein differenziertes Flimmerepithel, sowie tracheobronchiale Epithelzellen auf der SIS (B) und der PET-Membran (E). HBEC3-KT differenzieren in ein polarisiertes Epithel mit kinozilienartigen Strukturen auf der apikalen Seite (C) und bilden auf der PET-Membran ein vergleichbares Epithel aus (F). Eine apikale Zellclusterbildung ist für Calu-3 auf der SIS sichtbar (G), VA10 zeigen ein kaum differenziertes Plattenepithel (H) und Cl-huAEC bilden einen leicht polarisierten und einheitlichen einschichtigen Zellrasen (I). n=9 (nasal, SIS), n=2 (nasal, PET), n=3 (tracheobronchial, SIS; MucilAirTM), n=4 (HBEC3-KT, SIS; HBEC3-KT, PET; Calu-3; VA10; Cl-huAEC). Maßstab: 50 μ m

In einer Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin und Eosin (siehe Abbildung 7) wurden die 3D-Gewebemodelle histomorphologisch charakterisiert und auf kinozilienartige Strukturen untersucht. Bei allen Modellen ist zu erkennen, dass Zellen entweder in die Matrix eingewandert sind (SIS) oder sich unterhalb der PET-Membran angesiedelt haben. Das nasale Modell auf der PET-Membran zeigt eine wesentlich dickere Zellschicht unterhalb der Membran (Abb. 7D), als MucilAirTM (Abb. 7E) oder HBEC3-KT auf der PET-Membran (Abb. 7F). Bei humanen nasalen Mukosamodellen auf der SIS und der

PET-Membran ist ein polarisiertes, mehrreihiges Epithel, das kinozilienartige Strukturen ausbildet, zu erkennen (Abb. 7A, D). Das humane tracheobronchiale Modell auf der SIS zeigt im Gegensatz zu dem nasalen Modell eine polarisierte, aber schmalere Epithelschicht mit kinozilienartigen Strukturen auf der apikalen Seite (Abb. 7B). Das kommerziell erhältliche MucilAirTM, welches ebenfalls mit tracheobronchialen Epithelzellen aufgebaut ist, zeigt ein polarisiertes mehrreihiges Epithel, welches nahezu komplett mit kinozilienartigen Strukturen bedeckt ist (Abb. 7D). Es ist auffällig, dass das nasale Modell auf der PET-Membran sowie das tracheobronchiale Modell auf der SIS (Abb. 7D, B) qualitativ betrachtet wesentlich weniger kinozilienartige Strukturen aufweisen, als das nasale Modell auf der SIS und das MucilAirTM-Modell (Abb. 7A, E). HBEC3-KT auf der SIS als auch auf der PET-Membran weisen beide ein polarisiertes Epithel mit sehr wenigen kinozilienartigen Zellausstülpungen auf (Abb. 7C, F). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Atemwegsmodellen, sind in keinem der auf Calu-3, VA10 sowie Cl-huAEC Zelllinien basierenden Modelle kinozilienartige Strukturen zu erkennen (Abb. 7G- I). Calu-3 zeigen Zellcluster und eine zu verifizierende schleimartige Struktur auf der apikalen Seite (Abb. 7G). In VA10 Modellen ist eine kaum differenzierte plattenepithel-ähnliche Oberfläche zu erkennen (Abb. 7H), wohingegen Cl-huAEC ein leicht polarisiertes und einheitliches Monolayer bilden (Abb. 7I).

5.1.4 Immunhistologische Untersuchung spezifischer Marker in Atemwegstestsystemen

Zur Verifizierung von Basalzellen und differenzierten Epithelzellen mittels Cytokeratin 5 (CK5) und Cytokeratin 18 (CK18) sowie zum Nachweis der zwei prominentesten Muzine des leitenden respiratorischen Systems, Mucin 5ac (Muc5ac) und Mucin 5b (Muc5b), wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen spezifische Antikörper durchgeführt (siehe Abbildung 8). CK5 ist in allen Gewebemodellen, ausgenommen Calu-3, auf der SIS sowie der PET-Membran apikal exprimiert, wohingegen CK18 in allen Gewebemodellen apikal exprimiert ist (Abb. 8A- G). In Modellen basierend auf den Zelllinien VA10 und Cl-huAEC ist die Anordnung der CK5- und CK18-exprimierenden Zellen nicht geordnet (Abb. 8D, E), während CK18-exprimierende Zellen in den Primärmodellen sowie den Modellen basierend auf der HBEC3-KT-Zelllinie oberhalb der CK5-exprimierenden Zellen angeordnet sind (Abb. 8A, B, F, G). Die Proteine Muc5ac sowie Muc5b sind in allen Modellen (Abb. 8H- U) außer Cl-huAEC (Abb. 8L, S) nachweisbar, wobei das Signal in VA10-basierenden Gewebemodellen (Abb. 8K) schwächer ist.

5 Ergebnisse

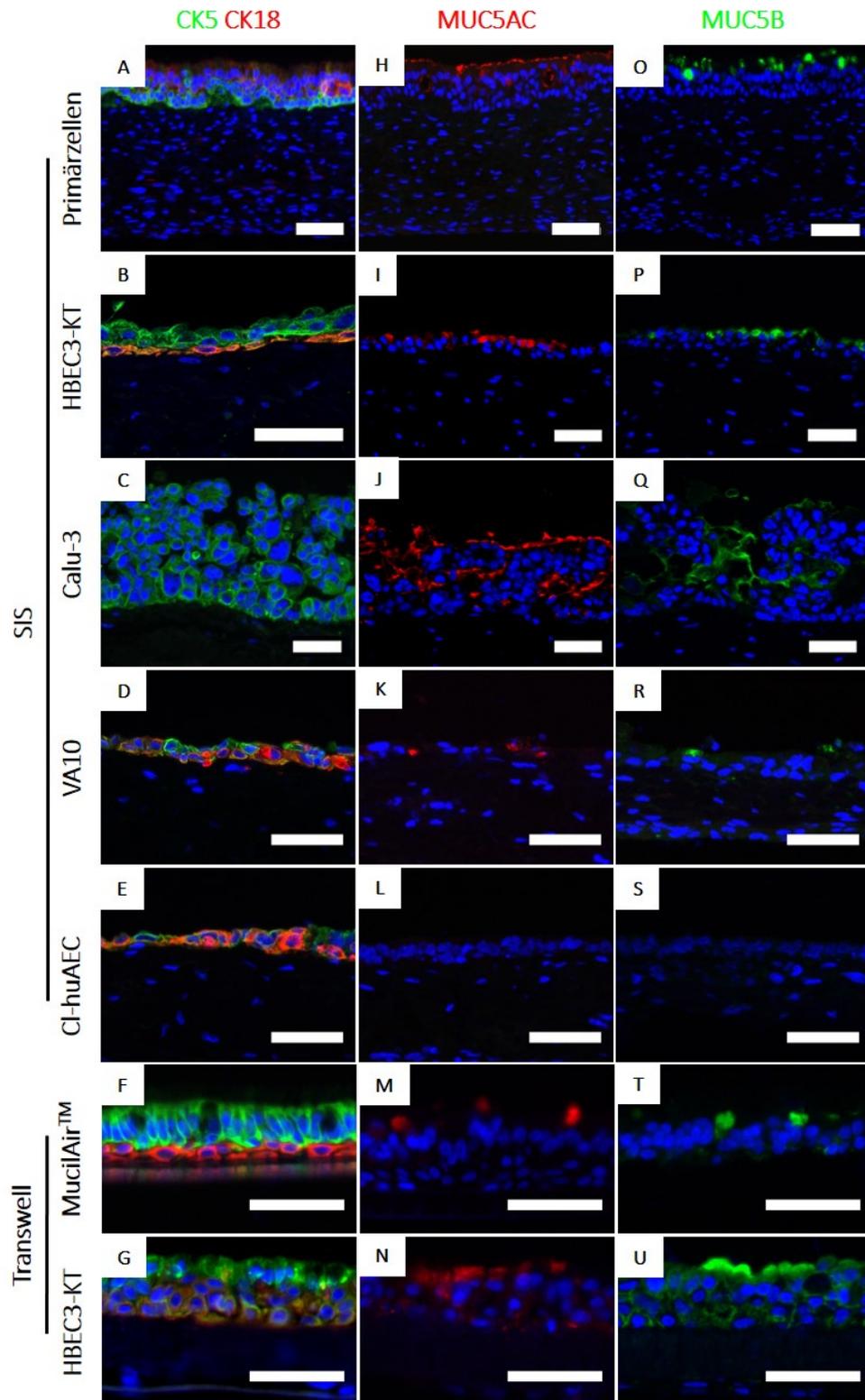


Abbildung 8: Immunhistologische Charakterisierung der 3D-Atemwegstestsysteme basierend auf unterschiedlichen Zellquellen und Matrices in Ko-Kultur mit respiratorischen Fibroblasten. A- G: Immunfluoreszenzfärbung gegen Cytokeratin 5 (grün) und Cytokeratin 18 (rot). H- N: Immunfluoreszenzfärbung gegen Muc5ac (rot) und O- U: gegen Muc5b (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau). n=9 (Primärzellen), n=3 (HBEC3-KT, SIS; MucilAirTM), n=4 (Calu-3; VA10; Cl-huAEC), n=2 (HBEC3-KT, PET). Maßstab: 50 μm

5.1.5 Ultrastrukturelle Analyse von Atemwegstestsystemen

Zur Verifizierung der Kinozilien in Primär- und HBEC3-KT-Modellen sowie zur ultrastrukturellen Charakterisierung der Testsysteme im Hinblick auf Basalmembran und *tight junctions* (TJ) wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abb. 9).

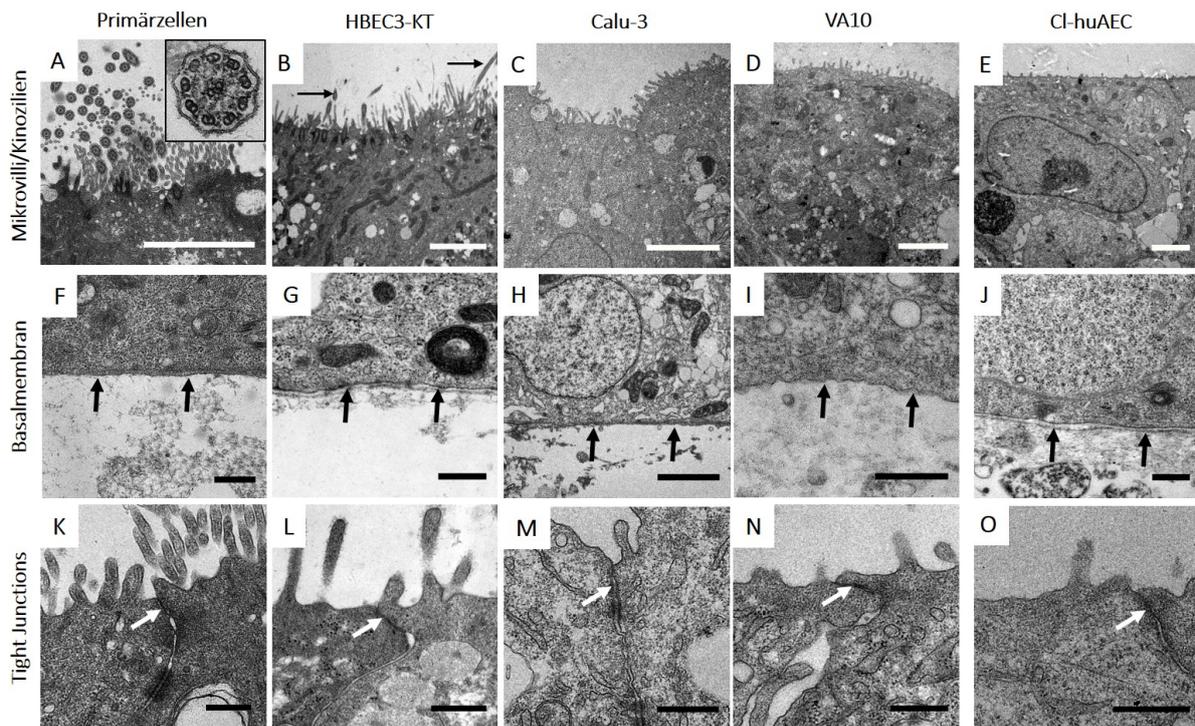


Abbildung 9: Ultrastrukturelle Analyse der 3D-Atemwegstestsysteme auf der SIS und basierend auf unterschiedlichen Zellquellen. Verifizierung von Kinozilien (A, B) bzw. Mikrovilli (C-E) sowie einer Basalmembran (F- J, schwarze Pfeile) und *Tight Junctions* (K- O, weißer Pfeil). n=3 (Primärzellen; HBEC3-KT; Calu-3; Cl-huAEC), n=1 (VA10). Maßstab: 3 μm (A- E), 0,5 μm (F- O)

Die ultrastrukturelle Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie verifiziert die kinozilienartigen Strukturen, welche in der HE-Färbung in Primär- sowie HBEC3-KT-Modellen zu erkennen sind (Abb. 7). In Primärmodellen sind Basalkörper und mehrere Zilienquerschnitte sichtbar (Abb. 9A). Bei genauerer Betrachtung der Querschnitte zeigt sich die typische 9x2+2 Konfiguration, bei welcher ein zentrales Mikrotubuluspaar von neun Mikrotubulidubletts umgeben ist (Abb. 9A, kleines Bild). In HBEC3-KT-Modellen sind ebenfalls Basalkörper und der Länge nach angeschnittene Kinozilien identifizierbar (Abb. 9B). In Calu-3, VA10 und Cl-huAEC sind lediglich Mikrovilli auf der Modelloberfläche zu erkennen (Abb. 9C - E). In allen Modellen sind eine Basalmembran (Abb. 9F -

J, schwarze Pfeile) sowie *tight junctions* (Abb. 9K - O, weißer Pfeil) zu sehen.

5.2 Funktionale Analyse im humanen 3D-Atemwegstestsystem

Um eine hohe Repräsentanz der 3D-Atemwegsmodelle mit der *in vivo* Situation zu bestätigen, ist neben bestimmter morphologischer Charakteristika ein funktionaler gerichteter Zilienschlag erforderlich. Da lediglich die 3D-Gewebemodelle basierend auf primären nasalen und tracheobronchialen Epithelzellen sowie HBEC3-KT auf der SIS und auf der PET-Membran Kinozilien ausbildeten, wurde ausschließlich deren Zilienschlag zunächst qualitativ und anschließend quantitativ untersucht. Bei der qualitativen Betrachtung der HBEC3-KT-Modelle, zeigten diese auf der PET-Membran keinen funktionalen Zilienschlag, weshalb keine quantitative Auswertung stattfand.

Da die Videodateien sehr groß sind, sind alle für diese Arbeit relevanten Videos auf einem universitären Server (**Q:\Literatur\Publikationen des Lehrstuhls\Abschlussarbeiten\Doktorarbeiten\Nina Lodes 2019**) abgelegt.

Für die Zilienschlaganalyse wurden für nasale Schleimhautmodelle auf der SIS vier Donoren (drei weibliche, ein männlicher, 24 - 35 Jahre), für nasale 3D-Modelle auf der PET-Membran zwei Spender (1 w, 1 m, 35 - 58 Jahre) sowie für tracheobronchiale 3D-Atemwegstestsysteme jeweils drei Spender auf der SIS und der PET-Membran (SIS: 3 m, 28 - 68 Jahre; PET: 1 w, 2 m, 15 - 66 Jahre) herangezogen.

5.2.1 Ziliäre Schlagfrequenz

Zur qualitativen Bewertung der 3D-Atemwegsmodelle basierend auf HBEC3-KT, tracheobronchialen und nasalen Epithelzellen wurde von jedem aufgenommenen Video zuerst eine sogenannte *heat map* erstellt, die die aktiven Bereiche der 3D-Modelle in rot aufzeigt und höhere Frequenzen in einem Farbverlauf nach gelb. In Abbildung 10 ist je eine repräsentative *heat map* sowie ein Histogramm der jeweiligen Modelle zu sehen.

In der *heat map* von HBEC3-KT sind lediglich drei Bereiche, in welchen ziliäre Aktivität detektierbar ist, dargestellt (Abb. 10A), wohingegen in humanen tracheobronchialen Epithelzell- (hTEC) und humanen nasalen Epithelzell- (hNEC) basierten Modellen schätzungsweise 70 - 80 % der Modelloberfläche ziliäre Aktivität aufweisen (Abb. 10B, C).

5 Ergebnisse

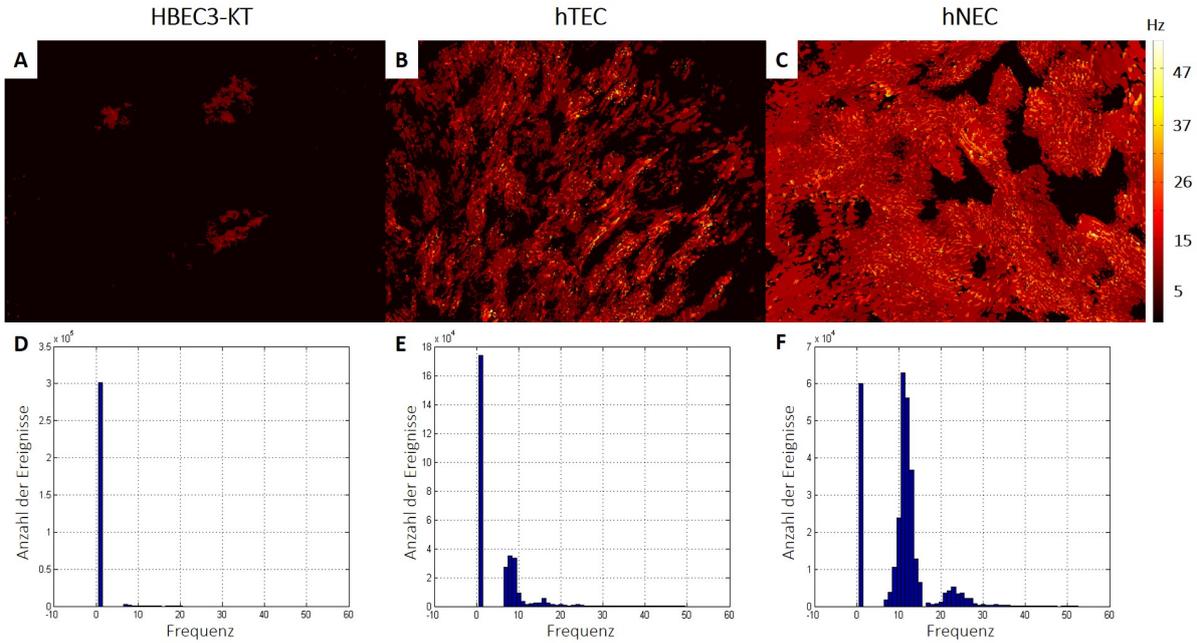


Abbildung 10: Repräsentative *heat maps* und Histogramme von HBEC3-KT-, hTEC- und hNEC-basierten 3D-Atemwegstestsystemen. Die ziliäre Aktivität der 3D-Modelle ist durch *heat maps* der Modelloberfläche dargestellt (A - C). Im Histogramm der jeweiligen Zelllinien- oder Primärzell-basierten Atemwegsmodelle ist die Anzahl der aktiven Bereiche gegen deren Frequenz aufgetragen (D- F). HBEC3-KT-basierte Atemwegsmodelle zeigen wenig ziliäre Aktivität im Gegensatz zu Primärzellbasierten Modellen, deren CBF hauptsächlich im Bereich 7 - 15 Hz liegt. n=3

Diese ist durch das Histogramm bestätigt, in welchem für HBEC3-KT sehr wenig bis keine Aktivität im Bereich ca. 10 Hz sichtbar ist (Abb. 10D), bei hTEC und hNEC jedoch ein hohes Aufkommen an Frequenzen im Bereich 7- 15 Hz zu erkennen ist (Abb. 10E, F). Anschließend fand die quantitative Zilienschlagfrequenzanalyse der nasalen bzw. tracheo-bronchialen Gewebemodelle auf der SIS und der PET-Membran bzw. MucilAirTM statt (Abbildung 11). Im nasalen Gewebemodell basierend auf der SIS ist über den Zeitraum von 30 Minuten ein tendenzieller Anstieg von 10,1 Hz auf 11,8 Hz zu erkennen, wohingegen bei nasalen Modelle basierend auf der synthetischen Matrix bis 20 min ebenfalls ein leichter, nicht signifikanter, Anstieg zu erkennen ist (10,1 Hz- 11,3 Hz) (Abb. 11A). Die durchschnittliche Zilienschlagfrequenz ist auf der SIS höher als auf der PET-Membran (11,3 Hz vs. 10,8 Hz).

5 Ergebnisse

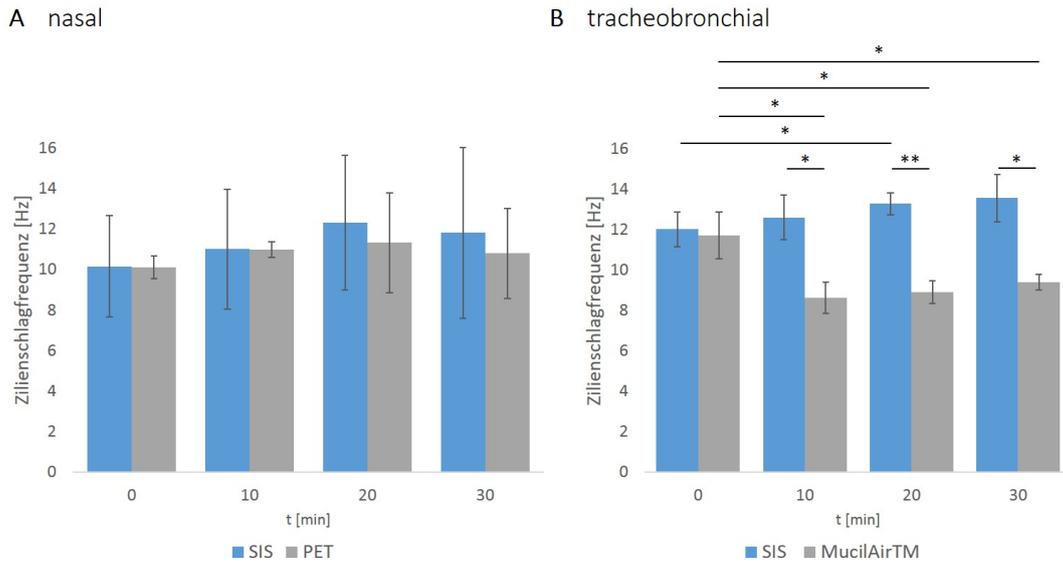


Abbildung 11: Quantitative Zilienschlagfrequenzanalyse von nasalen und tracheobronchialen 3D-Atemwegsmodellen basierend auf der SIS oder der PET-Membran. Die CBF im nasalen Modell auf der SIS bzw. der PET-Membran ist über 30 Minuten nahezu konstant, wohingegen die CBF tracheobronchialer Modelle auf der SIS ansteigt und auf der PET-Membran abnimmt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD repräsentiert. Student's T-Test, zweiseitig, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Nasale Modelle: $n=6$ (SIS), $n=2$ (PET-Membran); tracheobronchiale Modelle: $n=3$ (SIS; MucilAirTM)

Im tracheobronchialen Gewebemodell auf der SIS (Abb. 11B) ist ein signifikanter Anstieg über einen Zeitraum von 20 Minuten zu verzeichnen (12,0 Hz- 13,3 Hz). Die Zilienschlagfrequenz der MucilAirTM ist anfangs nahezu identisch mit der auf der SIS (11,7 Hz vs. 12,0 Hz), wobei ein signifikanter Abfall von 0 auf 10 Minuten sowie von 0 auf 20 Minuten und 0 auf 30 Minuten zu erkennen ist. Die Frequenzunterschiede der tracheobronchialen Modelle auf der SIS und der PET-Membran sind zu Zeitpunkt 10, 20 und 30 Minuten jeweils signifikant.

Da vor allem bei den nasalen Gewebemodellen hohe Standardabweichungen zu erkennen sind, ist es notwendig, die Daten nicht nur allgemein, sondern donorspezifisch zu betrachten. Hierbei ist bei nasalen Modellen auf der SIS auffällig, dass Donor 1 und Donor 2 ähnliche Schlagfrequenzen im Bereich 11,4 - 14,5 Hz über 30 Minuten aufweisen, wohingegen Donor 3 wesentlich niedrigere (8,5 - 10,0 Hz) und Donor 4 wesentlich höhere (14,5 - 18,9 Hz) Schlagfrequenzen über 30 Minuten zeigen.

5 Ergebnisse

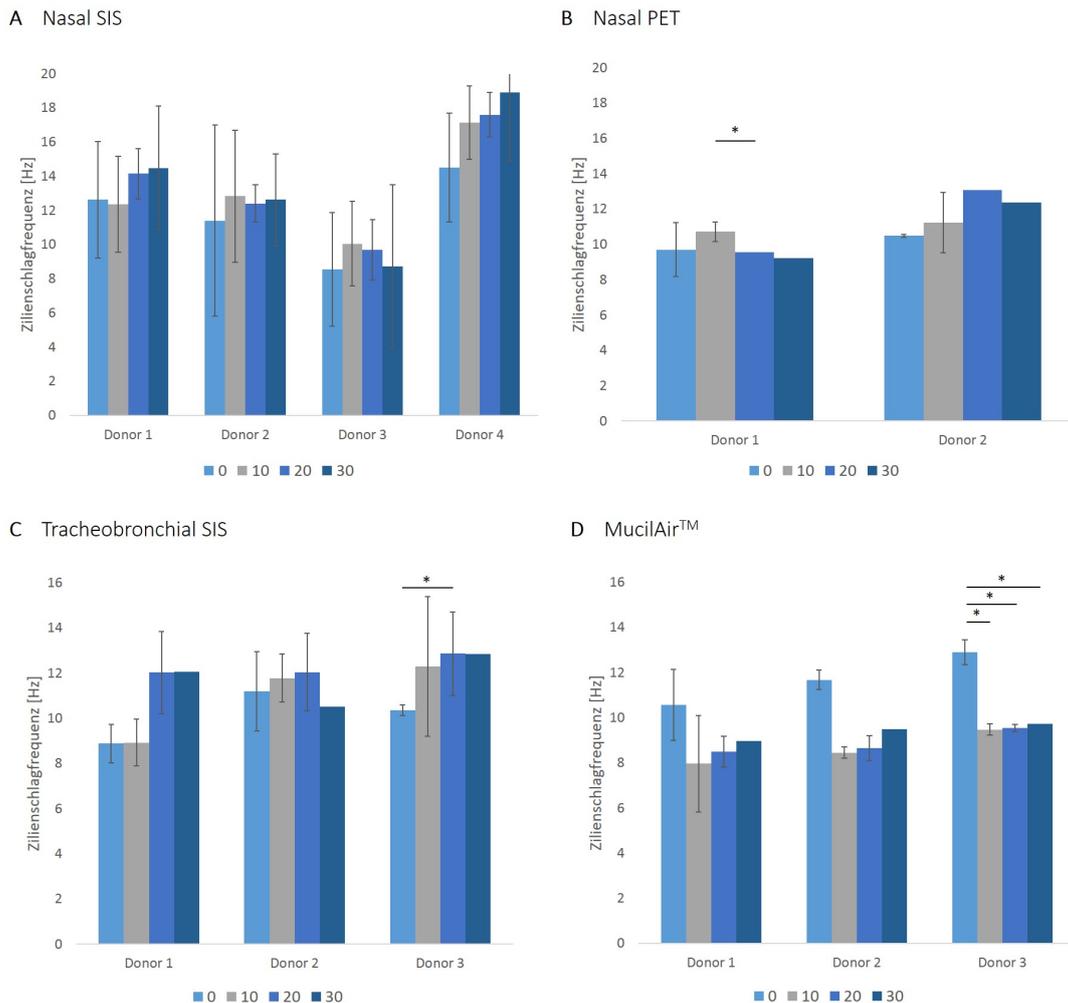


Abbildung 12: Donorspezifische Zilienschlagfrequenzanalyse von nasalen und tracheobronchialen 3D-Atemwegsmodellen basierend auf der SIS oder der PET-Membran. Die nasale CBF auf der SIS zeigt Donor 1- 3 mit nahezu gleichen Werten und Donor 4, der eine höhere CBF zeigt (A). Auf der PET-Membran zeigen beide nasale Donoren eine ähnliche CBF (B). Die tracheobronchiale CBF auf der SIS (C) und der PET-Membran (D) befindet sich im gleichen Bereich, jedoch nimmt die CBF zweier Spender auf der SIS zu, wohingegen in MucilAirTM Modellen die CBF nach 10 min bei allen drei Donoren abnimmt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD repräsentiert. Student's T-Test, zweiseitig, * $p < 0.05$. Nasale Modelle: $n = 6$ (SIS), $n = 2$ (PET-Membran); tracheobronchiale Modelle: $n = 3$ (SIS; MucilAirTM)

Bei den Spendern 1, 2 und 3 sieht man eine relativ konstante Frequenz über den Zeitraum von 30 Minuten, wohingegen bei Spender 4 ein nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen ist (Abb. 12A). Im Gegensatz zu den nasalen Modellen auf der SIS mit einer durchschnittlichen Schlagfrequenz von 13,0 Hz, zeigen die nasalen Modelle auf der PET-Membran einen niedrigeren Durchschnittswert von 10,8 Hz. Bei den nasalen Modellen auf der synthetischen Matrix ist neben einer relativ konstanten Frequenz über 30 Minuten zu

5 Ergebnisse

erkennen, dass die Frequenz des Donors 2 (identisch zu Donor 4 auf der SIS) geringfügig höher ist, als die des Donors 1 (11,8 Hz vs. 9,8 Hz). Der leichte Abfall bei Donor 1 von 10 auf 20 Minuten ist signifikant (10,7 vs 9,6 Hz) (Abb. 12B).

Bei individueller Betrachtung der tracheobronchialen Modelle auf der SIS (Abb. 12C) ist bei Donor 1 ein nicht signifikanter Anstieg von 10 auf 20 bzw. 30 Minuten zu erkennen (8,9 - 12,1 Hz bzw. 10,3 - 12,8 Hz), wohingegen Donor 2 eine relativ konstante Schlagfrequenz bei 11,4 Hz über den Zeitraum von 30 Minuten aufweist. Bei Donor 3 ist ebenfalls ein Anstieg der Frequenz zu erkennen, welcher von 0 auf 20 Minuten signifikant ist (10,3 vs. 12,9 Hz).

Bei tracheobronchialen Modellen auf PET-Membran (MucilAirTM) (Abb. 12D) zeigt sich bei allen drei Donoren an Zeitpunkt 0 Minuten eine höhere Schlagfrequenz (10,6 vs. 11,7 vs. 12,9 Hz), die über 10 Minuten abnimmt (8,0 vs. 8,5 vs. 9,5 Hz) und anschließend bei ca. 9 Hz konstant bleibt. Donor 3 zeigt einen signifikanten Abfall der Frequenz von 0 zu 10, 20 bzw. 30 Minuten (12,9 Hz vs. 9,5, 9,5 und 9,7 Hz).

5.2.2 Der Einfluss von isotonischer Kochsalzlösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz

Es wurde gezeigt, dass in den 3D-Atemwegsmodellen ein funktionaler und gerichteter Zilienschlag auftritt (Abb. 11 und Abb. ??). Zur Untersuchung, ob verschiedene Substanzen einen Einfluss auf die Schlagfrequenz zeigen, wurden isotope Kochsalzlösung und Salbutamol über ein Verneblungssystem appliziert. Der zeitliche Verlauf nach Zugabe der beiden Substanzen ist in Abbildung 13 dargestellt.

Zunächst wurden die Modelle über einen Zeitraum von 30 Minuten kalibriert, woraufhin nach 30 Minuten die Zugabe von 0,9 % NaCl-Lösung stattfand. Anschließend folgte ein erneuter Messzeitraum von 30 Minuten bis Salbutamol auf die Modelle appliziert wurde. Es ist zu erkennen, dass während der gesamten Messung die durchschnittliche Zilienschlagfrequenz in nasalen Gewebemodellen höher ist, als im tracheobronchialen Modell (14,7 vs. 12,6 Hz). Nach Zugabe von 0,9 % NaCl-Lösung an Zeitpunkt 30 Minuten ist in beiden Modellen ein nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen, der über die nächsten 30 Minuten im nasalen Modell weitestgehend konstant bei 14,9 Hz bleibt, jedoch im tracheobronchialen Modell auf 9,4 Hz abnimmt. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Zilienschlagfrequenz der beiden Modelle an Zeitpunkt 45, 50 und 60 Minuten. Die Standardabweichungen sind im nasalen Modell an den vorher genannten Zeitpunkten auffällig hoch im Gegensatz zum tracheobronchialen Modell, welches lediglich an Zeitpunkt

5 Ergebnisse

60 Minuten eine hohe Standardabweichung aufweist. Nach der Zugabe von Salbutamol steigt die Schlagfrequenz auf ihr jeweiliges Maximum an, welches im nasalen Modell 16,2 Hz beträgt. Im tracheobronchialen Modell steigt sie signifikant auf 15,9 Hz an. Die CBF bleibt im nasalen Modell erneut konstant bei durchschnittlich 15,8 Hz, wohingegen sie im tracheobronchialen Modell erneut nicht signifikant auf 13,7 Hz absinkt.

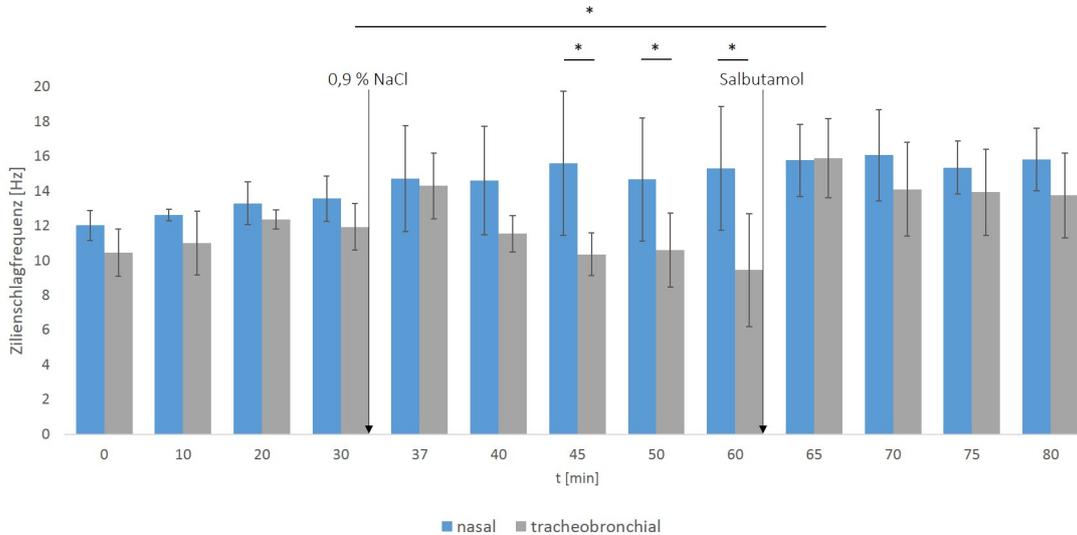


Abbildung 13: Einfluss von 0,9 % NaCl-Lösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz in nasalen und tracheobronchialen Atemwegsmodellen basierend auf der SIS im zeitlichen Verlauf. Die Zilienschlagfrequenz wird im nasalen und tracheobronchialen Modell nach Applikation von 0,9 % NaCl-Lösung und Salbutamol analysiert. In beiden Modellen ist nach der Zugabe von isotoner Kochsalzlösung ein Anstieg zu sehen, welcher im nasalen Modell konstant bleibt und im tracheobronchialen Modell abnimmt. Nach Salbutamolzugabe erhöht sich die Frequenz in beiden Modellen. Im nasalen Modell bleibt diese konstant, im tracheobronchialen nimmt diese erneut ab. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD repräsentiert. Student's T-Test, zweiseitig, * $p < 0.05$. $n=3$

Zusätzlich zum zeitlichen Verlauf nach Substanzzugabe wurden die Messwerte in Abb. 14 zusammengefasst, sodass die Schlagfrequenzen vor Substanzapplikation mit den Werten nach Substanzapplikation verglichen werden können. Wie bereits in Abb. 13 zu sehen ist, ist die Schlagfrequenz in nasalen Gewebemodellen höher. Die Werte beider respiratorischer Modelle weisen nach der Applikation 0,9 %-iger NaCl-Lösung ebenso wie nach Salbutamolzugabe einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu vor der jeweiligen Substanzapplikation auf. Im nasalen Modell ist ein nicht signifikanter Anstieg der Frequenz nach Zugabe von isotoner Kochsalzlösung zu sehen, wobei die Frequenz im tracheobronchialen Modell weitestgehend konstant bleibt und ebenfalls keinen signifikanten Unter-

5 Ergebnisse

schied darstellt (nasal: 12,8 Hz vs. 14,5 Hz, tracheobronchial: 11,7 Hz vs. 11,5 Hz). Es ist zu erkennen, dass ein signifikanter Anstieg in beiden respiratorischen Modellen nach Salbutamolzugabe vorliegt. Im nasalen Modell steigt der Wert von 12,8 Hz auf 15,8 Hz, wobei im tracheobronchialen Modell die CBF von 11,7 Hz auf 14,1 Hz zunimmt. Zudem ist eine Signifikanz der Schlagfrequenz des nasalen im Vergleich zum tracheobronchialen Modell nach der Applikation von isotoner Kochsalzlösung sowie Salbutamol nachzuweisen.

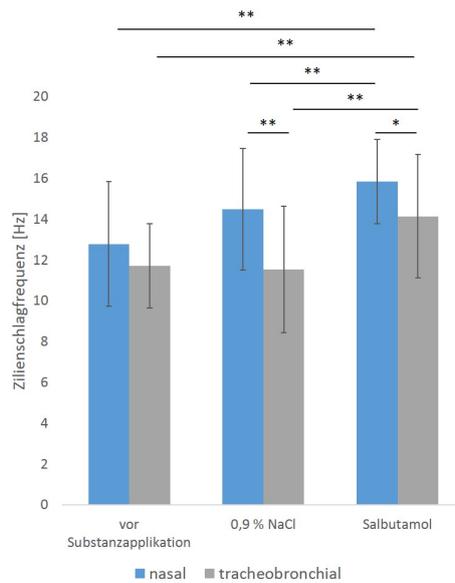


Abbildung 14: Einfluss von 0,9 % NaCl-Lösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz in nasalen und tracheobronchialen 3D-Atemwegsmodellen. Die Zilienschlagfrequenz nimmt nach der Zugabe isotoner Kochsalzlösung im Vergleich zu vor der Substanzapplikation im nasalen Modell zu und bleibt im tracheobronchialen weitestgehend konstant. Ebenfalls ist ein signifikanter Anstieg nach Salbutamolzugabe im Vergleich zur Kontrolle in beiden Modellen zu erkennen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD repräsentiert. Student's T-Test, zweiseitig, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. $n=3$

5.2.3 Mukoziliärer Transport

Zur Verifizierung eines funktionalen und gleich gerichteten Zilienschlags der 3D-Atemwegstestsysteme wurde durch Zugabe von Dynabeads™ die mukoziliäre Transportgeschwindigkeit analysiert. Es zeigt sich, dass in Gewebemodellen, die entweder auf der SIS (Abb. 15A) oder der PET-Membran (Abb. 15C) basieren, der Partikeltransport gerichtet stattfindet (Abb. 15B, D). Die Analyse des mukoziliären Transports zeigt, dass die Partikel im 3D-Gewebemodell basierend auf der biologischen Matrix mit einer Geschwindigkeit von $395,0 \mu\text{m/s}$ transportiert werden, wohingegen die Transportgeschwindigkeit im Modell auf

5 Ergebnisse

der PET-Membran niedriger ist ($328,6 \mu\text{m/s}$) (Abb. 15E). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Modellen auf der SIS und der PET-Membran.

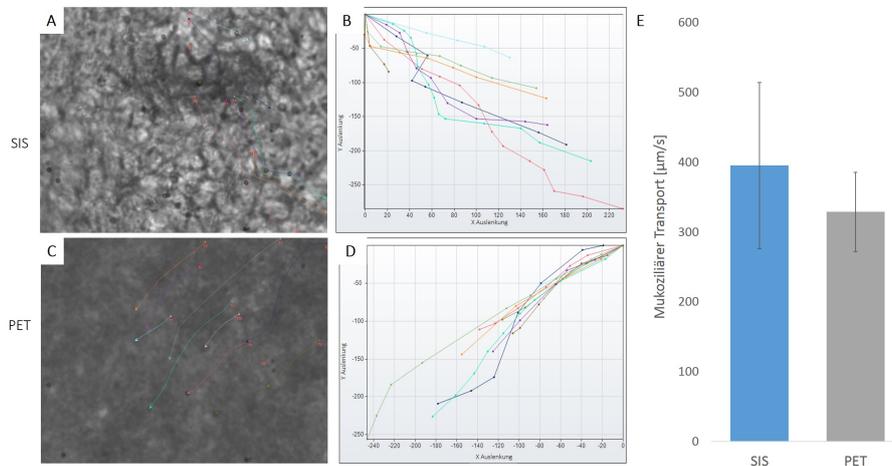


Abbildung 15: Qualitative und quantitative Analyse des mukoziliären Transports in 3D-Atemwegstestsyste-men basierend auf der SIS und der PET-Membran. Ein funktio-naler, gerichteter Zilienschlag ist in 3D-Atemwegstestsyste-men sowohl auf der SIS (A, B) als auch auf der PET-Membran (C, D) zu erkennen. Die mukoziliäre Transportgeschwindigkeit ist auf 3D-Gewebemodellen basierend auf der SIS mit $395,0 \mu\text{m/s}$ tendenziell höher als auf der PET-Membran, wo diese $328,6 \mu\text{m/s}$ beträgt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD repräsentiert. $n=4$ (SIS), $n=3$ (PET)

5.3 Definierte Krankheitsmodelle

Im Rahmen dieser Dissertation wurden individualisierte Krankheitsmodelle für die zys-tische Fibrose und die primäre Ziliendyskinesie erstellt. Für CF-Modelle wurden einerseits kommerziell erhältliche MucilAirTM von zwei CF-Spendern der Firma Epithelix herange-zogen, zum anderen mit Epithelzellen der gleichen zwei Donoren, die ebenfalls kommerzi-ell von der Firma Epithelix verfügbar waren, auf PET-Membran aufgebaut. Für die PCD wurden Epithelzellen von drei Spendern herangezogen und Modelle basierend auf der SIS aufgebaut. Die Modelle wurden anschließend histomorphologisch charakterisiert. Es fand eine quantitative Analyse der Zilienschlagfrequenz sowie des mukoziliären Transports, die Charakterisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen den spezifischen Marker Muc5ac und die elektronenmikroskopische Analyse der Modelloberfläche in CF-Modellen statt, wohingegen in PCD-Modellen die Querschnitte der Kinozilien ultrastrukturell un-tersucht wurden.

5.3.1 Zystische Fibrose

Die Abbildung 16 zeigt je ein repräsentatives Modell für beide Donoren. Die Morphologie der 3D-Gewebemodelle auf der PET-Membran von zwei Mukoviszidose Patienten wurde mittels HE-Färbung untersucht (Abb. 16A, B). Es haben sich sowohl unterhalb als auch oberhalb der PET-Membran Zellen angesiedelt. Unterhalb der PET-Membran weisen die Zellen eine spindelförmige Morphologie auf. Beide Spender zeigen apikal ein polarisiertes Epithel. Es sind Zellen, die kinozilienartige Strukturen aufweisen, zu erkennen. Um zu verifizieren, dass es sich bei den sich unterscheidenden Zellen um schleimproduzierende Becherzellen handelt, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen Muc5ac der apikale Mukus charakterisiert und bei beiden Spendern ist eine starke Muc5ac-Expression zu sehen (Abb. 16C, D). Zur spezifischeren Untersuchung der Modelloberfläche wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, die in Abbildung 16E und F dargestellt sind. Die Modelloberfläche beider Patienten ist schätzungsweise zu 90 % mit Kinozilien bedeckt.

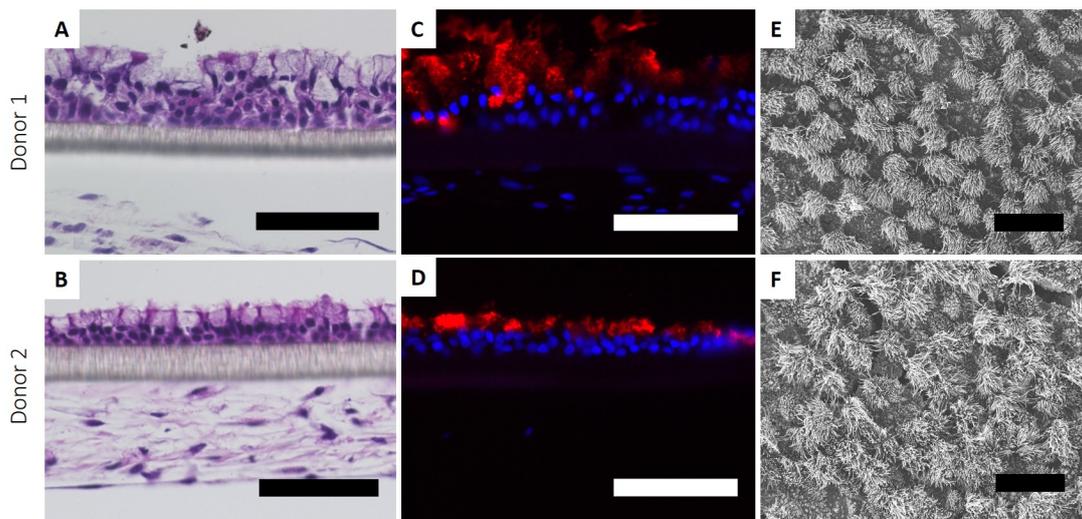


Abbildung 16: HE-, Immunfluoreszenzfärbung gegen Muc5ac und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von CF-Modellen. Zur histomorphologischen Charakterisierung der CF-Modelle zweier Donoren erfolgte eine HE-Färbung. Diese zeigt ein polarisiertes Epithel (A, B). Die schleimproduzierenden Zellen wurden mittels IF gegen Muc5ac (rot) verifiziert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt (C, D). Die REM-Aufnahmen zeigen eine schätzungsweise zu 90 % Kinozilien-besetzte Modelloberfläche (E, F). n=3. Maßstab: 75 μm (A- D), 25 μm (E, F).

5 Ergebnisse

In CF-Modellen wurde eine Analyse der Zilienschlagfrequenz durchgeführt (Abb. 17). Bei qualitativer Betrachtung der CF-Modelle war ein verlangsamter Zilienschlag aufgrund einer zähflüssigen Schleimschicht zu erkennen, die für eine erfolgreiche Durchführung des Experiments mit zellspezifischem Medium herunter gewaschen werden musste. Bei anschließender quantitativer Analyse der Zilienschlagfrequenz sind Frequenzen in einem Bereich von 9,1 - 10,9 Hz für Donor 1 und 8,9 - 9,9 Hz für Donor 2 zu erkennen, welche vergleichbar mit den gesunden Primärmodellen auf der PET-Membran-Membran sind (Abb. 11).

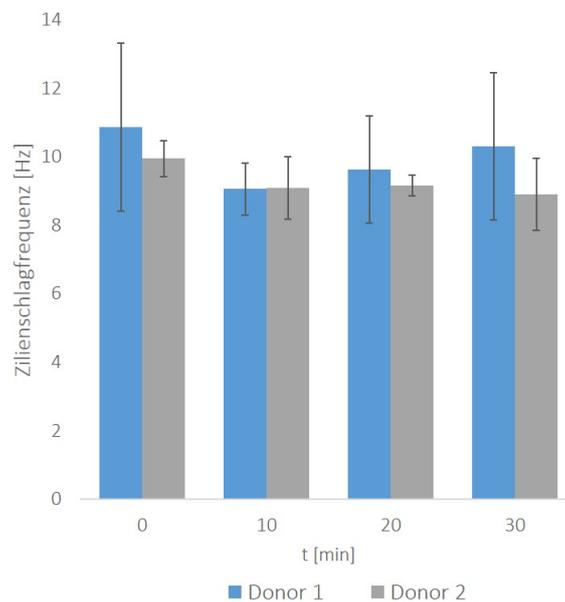


Abbildung 17: Zilienschlagfrequenzanalyse der CF-Modelle. Der Zilienschlag von 3D-Modellen zweier CF-Patienten wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Spendern gezeigt werden. Die Frequenz bleibt über den gesamten Zeitraum nach einem leichten Absinken nach 10 Minuten konstant. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD repräsentiert. n=2 (Donor 1), n=3 (Donor 2)

In der Frequenzanalyse der CF-Modelle ist zunächst ein leichter Abfall und anschließend eine konstantbleibende Frequenz beider Donoren über 30 Minuten zu sehen. Die Frequenz des Donors 1 ist an den Messpunkten 0 Minuten, 20 Minuten und 30 Minuten tendenziell etwas höher als die des Donors 2. Keiner der beiden Patienten weist einen signifikanten Unterschied in deren Schlagfrequenz an einem der Messpunkte bzw. während des gesamten Messzeitraums auf.

5 Ergebnisse

Da in CF-Patienten aufgrund des zähflüssigen Mukus der mukoziliäre Transport eingeschränkt ist, wurde dieser durch den Transport von DynabeadsTM untersucht und dem von nicht-CF-Spendern gegenüber gestellt. Die qualitative Analyse zeigt, dass in den 3D-Gewebemodellen der CF-Patienten im Gegensatz zu den nicht-CF Modellen der Partikeltransport ungeordnet abläuft und kein auf der gesamten Modelloberfläche gerichteter Zilienschlag vorhanden ist. Es ist zu sehen, dass die Partikel in CF-Modellen entweder langsamer bzw. über kürzere Distanzen transportiert werden oder gänzlich im zähflüssigen Mukus steckenbleiben (siehe Videos auf Laufwerk Q: *CF Donor 1*, *CF Donor 2*). Die gesunden Modelle zeigen, wie bereits in Kapitel 5.2.3 erläutert, einen gerichteten Zilienschlag und dadurch einen gerichteten Transport über die Modelloberfläche. Die anschließende quantitative Analyse gibt Aufschluss über die Unterschiede des mukoziliären Transports in CF und gesunden Atemwegstestsystemen. Die Partikel in CF-Modellen werden sehr viel langsamer und mit einer Transportgeschwindigkeit von 148,1 $\mu\text{m/s}$ (Donor 1) bzw. 78,2 $\mu\text{m/s}$ (Donor 2) bewegt, wohingegen die Transportgeschwindigkeit in gesunden Atemwegsmodellen 328,6 $\mu\text{m/s}$ beträgt (Abb. 18E).

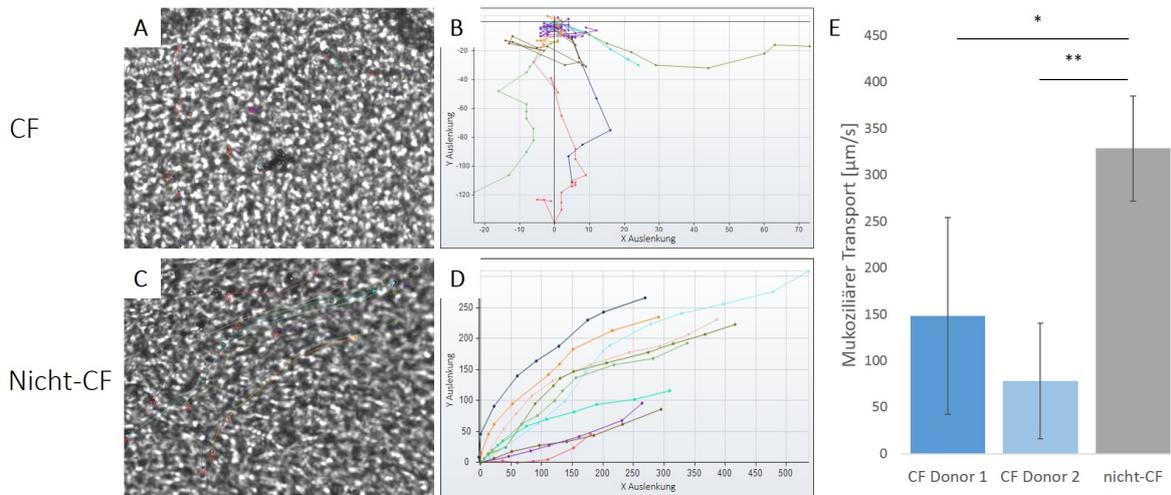


Abbildung 18: Qualitative und quantitative Analyse des mukoziliären Transports in CF- vs. nicht-CF-Atemwegstestsystemen. In CF-Modellen ist kein gerichteter Transport identifizierbar, wohingegen in nicht-CF-Atemwegsmodellen ein gerichteter mukoziliärer Transport nachgewiesen werden kann. Der mukoziliäre Transport in CF-Modellen von zwei Spendern ist deutlich geringer, als in nicht-CF-Atemwegsmodellen (E). Es besteht jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den CF-Donoren und den nicht-CF-Modellen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD repräsentiert. Student's T-Test, zweiseitig, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. $n=2$ (CF Donor 1), $n=4$ (CF Donor 2), $n=3$ (nicht-CF)

5.3.2 Primäre Ziliendyskinesie

Die PCD-Modelle wurden mittels Immunfluoreszenz auf spezifische Marker der Atemwege untersucht. Eine repräsentative Abbildung der PCD-Modelle ist in Abbildung 19 für den PCD-Donor 1 gezeigt. Vimentin ist lediglich innerhalb der Matrix exprimiert und weist auf die in die SIS migrierten Fibroblasten hin (Abb. 19A). Zellen, die positiv für CK5 und CK18 sind, haben sich oberhalb der Matrix angesiedelt, wobei die CK18-exprimierenden Zellen über den CK5-positiven Zellen positioniert sind (Abb. 19B). Ebenfalls sind positive Signale für Muc5ac und Muc5b auf der apikalen Seite der Modelle zu erkennen (Abb. 19C, D).

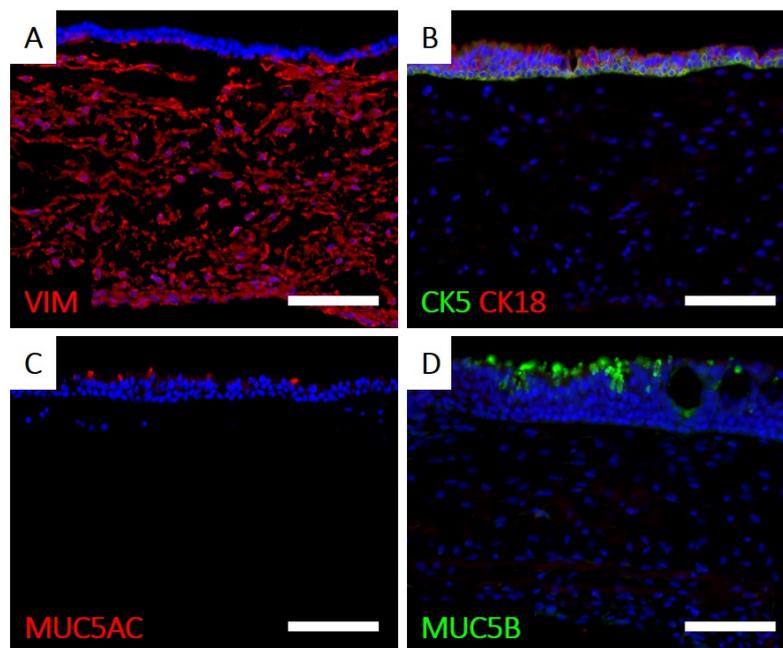


Abbildung 19: Immunhistologische Charakterisierung der PCD-Modelle. Ein positives Signal für Vimentin (rot) kann innerhalb der SIS nachgewiesen werden (A). CK5-(grün) sowie CK18-positiv (rot) Zellen sind apikal zu erkennen (B). Ebenfalls sind die beiden Muzine Muc5ac (rot) (C) und Muc5b (grün) (D) in der Immunfluoreszenzfärbung zu identifizieren. Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau). n=4. Maßstab: 100 μm .

Die patientenspezifischen Krankheitsmodelle wurden morphologisch mittels HE-Färbung charakterisiert. Die Übersichtsfärbung zeigt bei allen drei Donoren eine vollständig differenzierte Epithelschicht, die kinzilienartige Strukturen auf der apikalen Oberfläche aufweisen (Abb. 20A - C). Diese wurden mittels TEM verifiziert, wo die in der Zellmembran verankerten Basalkörper und deren longitudinal sowie axial angeschnittene Axone-

5 Ergebnisse

me sichtbar sind (Abb. 20D - F). Zur spezifischeren Betrachtung wurden die Zilienquerschnitte im Detail analysiert, um mögliche fehlende Strukturen darzulegen (Abb. 20G - L), wobei die detailliertere Kinozilienquerschnitte in Abbildung 20J - L darstellt sind. In den Querschnitten der drei PCD-Patienten sieht man die typische $9 \times 2 + 2$ Anordnung der Mikrotubuli. Bei Donor 1 fehlen, im Vergleich zu dem Zilienquerschnitt eines nicht erkrankten Menschen (Abb. 9A, klein), die äußeren Dyneinarme (Abb. 20G, J). In den Zilienquerschnitten des Donors 2 sind weder innere Dyneinarme noch äußere Dyneinarme zu erkennen (Abb. 20H, K) und Donor 3 weist lediglich äußere Dyneinarme auf (Abb. 20I, L).

Zur weiteren Charakterisierung fand bei jedem PCD-Modell eine qualitative Analyse der ziliären Aktivität statt, welche bei keinem der Modelle einen funktionalen Zilienschlag erkennen ließ. Im Video des Donors 1 (siehe Video auf Laufwerk Q: *PCD Donor 1*) lassen sich ziliäre Strukturen erkennen, die sich jedoch nicht bewegen. In den Videos des Donors 2 (siehe Video auf Laufwerk Q: *PCD Donor 2*) und 3 (siehe Video auf Laufwerk Q: *PCD Donor 3*) ist ebenfalls kein funktionaler Zilienschlag zu identifizieren.

5 Ergebnisse

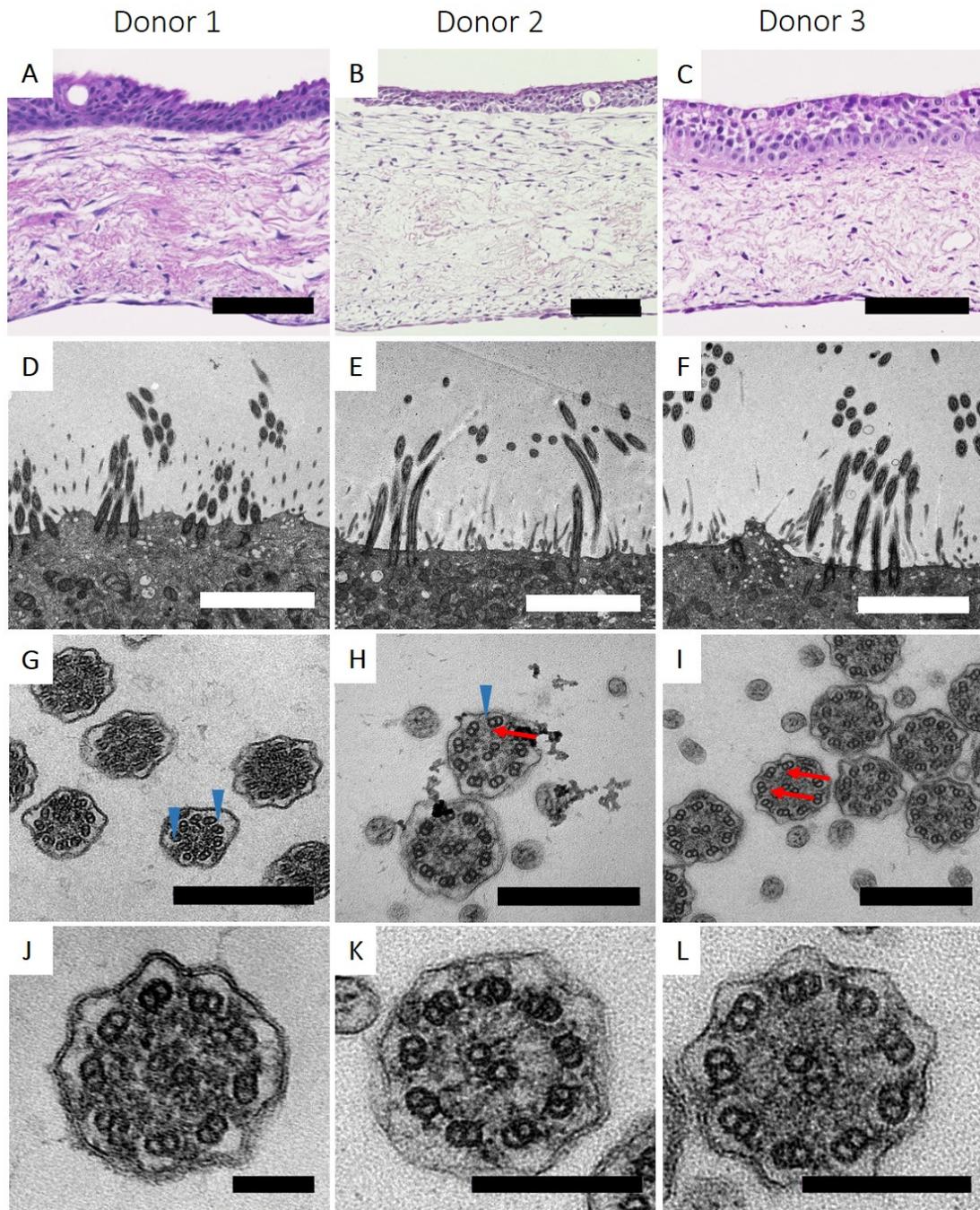


Abbildung 20: Histomorphologische Charakterisierung und ultrastrukturelle Analyse von PCD-Modellen und Zilienquerschnitten. Die HE-Färbung der PCD-Modelle von drei Donoren zeigt ein differenziertes Atemwegepithel mit kinozilienartigen Strukturen an der Oberfläche (A - C). Kinozilien wurden mit Hilfe von TEM-Aufnahmen verifiziert (D - F). Die Zilienquerschnitte liefern eine detaillierte Übersicht der Mikrotubulianordnung und einzelner Strukturen, die für eine Fehlfunktion ursächlich sind (G - L). Bei Donor 1 sind ODA absent (G, blaue Pfeilspitzen), wohingegen Donor 2 weder ODA (H, blaue Pfeilspitze), noch IDA (H, roter Pfeil) aufweist. In Zilienquerschnitten des Donors 3 sind keine IDA zu erkennen (I, rote Pfeile). n=3 (HE), n=1 (TEM). Maßstab: 100 μm (A - C), 3 μm (D - F), 0,5 μm (G, H), 0,4 μm (G, I), 1 μm (J) und 0,2 μm (K, L).

5.4 Raman-Spektroskopie zur nicht-invasiven Analyse von Patientenzellen

Zur Identifizierung eines Biomarkers für die zystische Fibrose als auch für die primäre Ziliendyskinesie wurden Epithelzellen der jeweiligen Spender sowie respiratorische Epithelzellen von nicht-CF bzw. nicht-PCD-Spendern als Kontrolle mittels nicht-invasiver Raman-Spektroskopie untersucht. Es wurden zunächst die Mittelwertspektren erstellt, um direkt mögliche Unterschiede zwischen erkrankten und nicht erkrankten Zellen sichtbar zu machen. Anschließend wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*) durchgeführt, in welcher mögliche gruppenspezifische Auftrennungen der Zellen analysiert werden. Mit Hilfe der sogenannten *loadings plots* wurden die für die Auftrennung relevanten *peaks* identifiziert.

5.4.1 Zystische Fibrose

Die Mittelwertspektren der CF-Zellen zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen nahezu identische Kurven (Abb. 21A). Im Wellenzahlbereich 600 - 1801 cm^{-1} kann in der PCA keine Auftrennung zwischen CF- und Kontrollzellen gezeigt werden (Abb. 21B).

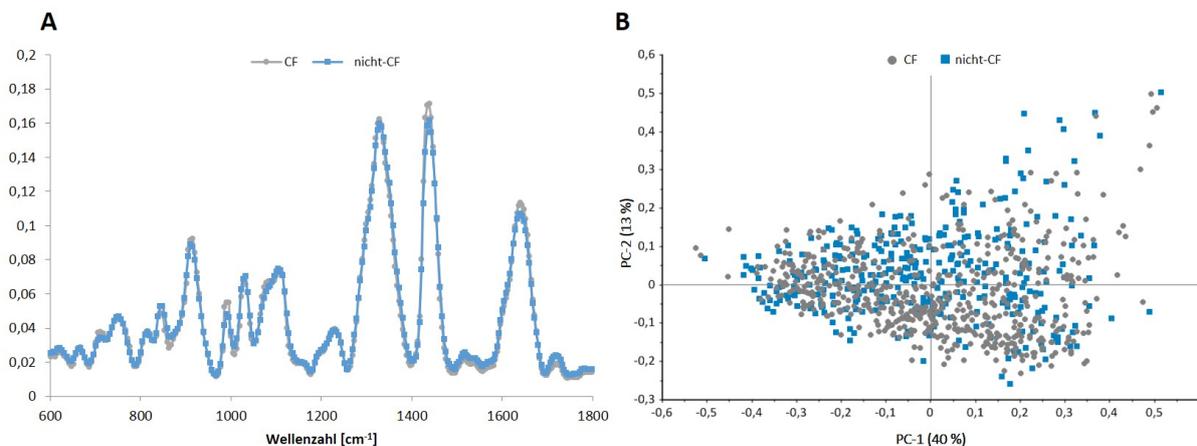


Abbildung 21: Mittelwertspektren und Hauptkomponentenanalyse von respiratorischen Epithelzellen CF- und nicht-CF-Erkrankter. Die Mittelwertspektren zeigen nahezu identische Werte der kranken und nicht-CF Atemwegsepithelzellen (A). CF-Zellen können mittels PCA nicht von den Kontrollzellen unterschieden werden (B). n=5

5.4.2 Primäre Ziliendyskinesie

In den Mittelwertspektren der PCD-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen über den Wellenzahlbereich 600 - 1801 cm^{-1} sind kleine Unterschiede identifizierbar (Abb. 22A). Die Werte der nicht-erkrankten Zellen sind bei ca. 850 cm^{-1} und bei ca. 1450 cm^{-1} höher als die der PCD-Zellen, wohingegen bei ca. 1340 cm^{-1} die Kurve der PCD-Zellen höher ist als die der nicht-PCD Zellen.

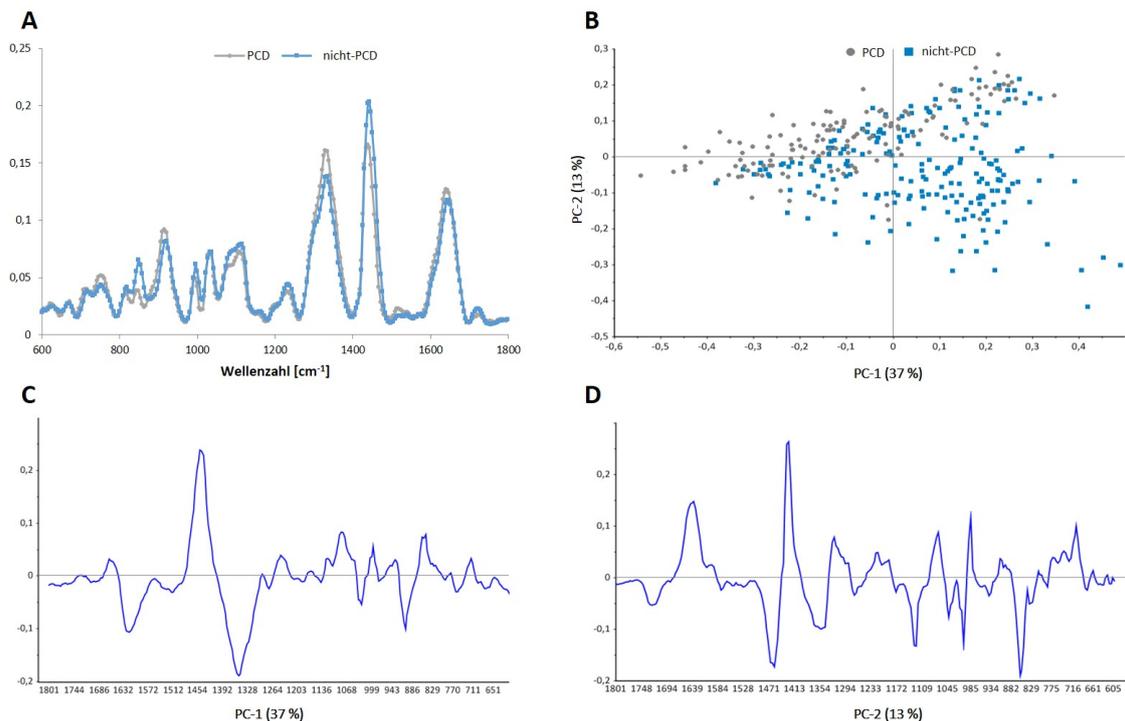


Abbildung 22: Mittelwertspektren, Hauptkomponentenanalyse und entsprechende *loadings plots* von respiratorischen Epithelzellen PCD- und nicht-PCD-Erkrankter. Das Mittelwertspektrum der PCD- und nicht-PCD Zellen zeigt einige Unterschiede (A). Die erkrankten können von den gesunden Zellen in der PCA über PC-1 und PC-2 aufgetrennt werden (B). In den *loadings plots* sieht man die für die Auftrennung relevanten Wellenzahlbereiche für PC-1 (C) und PC-2 (D). n=3

Die PCA wurde zunächst über den gesamten Wellenzahlbereich (600 - 1800 cm^{-1}) durchgeführt. Hierbei lässt sich erkennen, dass sich die Messungen der PCD-Patienten und der nicht-PCD Epithelzellen über Hauptkomponente 1 (PC-1) mit einer Relevanz von 37 % und über Hauptkomponente 2 (PC-2) mit einer Relevanz von 13 % etwas auftrennen lassen (Abb. 22B). Es ist eine Clusterbildung im rechten unteren Quadranten zu erkennen, welcher sich auf die Zellen des nicht-PCD Spenders 6 zurückführen lässt und

5 Ergebnisse

unabhängig vom Messtag ist. Die *loadings plots* der PC-1 und PC-2 sind in Abbildung 22C und D dargestellt. Hier sind die Wellenzahlbereiche erkennbar, die für die Auftrennung verantwortlich sind. In der anschließenden PCA wurden über alle *peaks* der *loadings plots* drei Bereiche identifiziert, die für die gruppenspezifische Auftrennung relevant sind. Diese decken sich nahezu mit den in den Mittelwertspektren identifizierten Unterschieden. Sie befinden sich in den Wellenzahlbereichen $848 - 862 \text{ cm}^{-1}$, $1316 - 1324 \text{ cm}^{-1}$ und $1458 - 1467 \text{ cm}^{-1}$, wobei die Auftrennung im Bereich $848 - 862 \text{ cm}^{-1}$ als relevanter angesehen wird, als in den beiden anderen Bereichen. Die entsprechenden *score plots* über die relevanten Wellenzahlbereiche sind in Abbildung 23 zu sehen, wobei sich diese mit den bereits analysierten Ergebnissen decken.

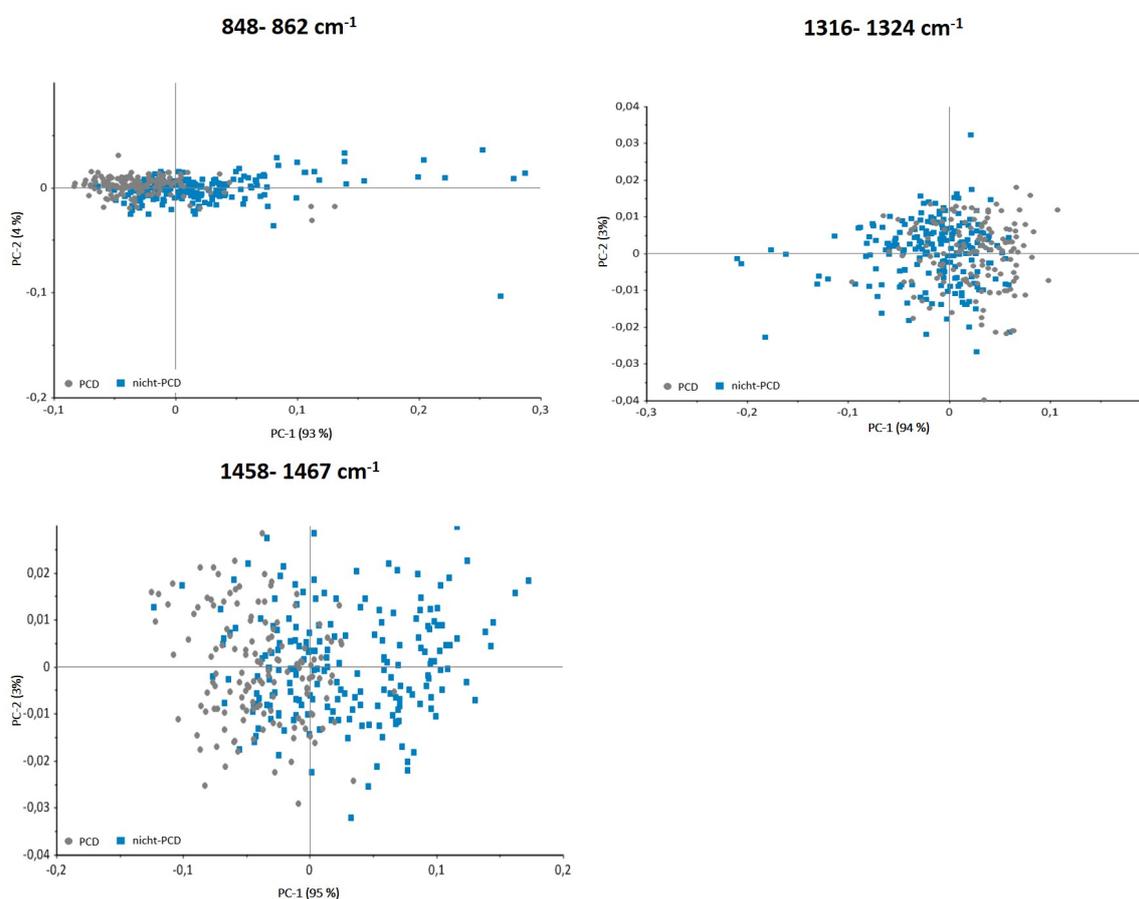


Abbildung 23: Score plots über relevante Bereiche der Auftrennung zwischen PCD und nicht-PCD Zellen. Die Wellenzahlbereiche $848 - 862 \text{ cm}^{-1}$ (A), $1316 - 1324 \text{ cm}^{-1}$ (B) und $1458 - 1467 \text{ cm}^{-1}$ (C) repräsentieren die für die Auftrennung relevanten Wellenzahlbereiche.

5 Ergebnisse

Tabelle 14: Konfusionsmatrix des PCA-LDA-Modells mit einer Gesamtgenauigkeit von 74,3 %. K= Kontrollzellen, PCD=PCD-Zellen

		Tatsächliche Bezeichnung	
		K	PCD
Vorausgesagte Bezeichnung	K	142	32
	PCD	57	108
Genauigkeit		71,4 %	77,1 %

Mit Hilfe der linearen Diskriminantenanalyse lassen sich diese Ergebnisse ebenfalls bestätigen. Die PCD bzw. nicht-PCD Zellen können laut LDA mit einer Genauigkeit von 77,1 % bzw. 71,4 % zugeordnet werden (siehe Tabelle 14).

6 Diskussion

In vorherigen Arbeiten konnte der Modellaufbau mit tracheobronchialen sowie nasalen Primärzellen basierend auf der biologischen Matrix SIS gezeigt werden [122, 147].

Im Zuge dieser Dissertation fand eine detaillierte Charakterisierung der Primärmodelle basierend auf der SIS sowie der PET-Membran statt. Um erstmals Informationen über den ziliären Apparat der generierten Atemwegsmodelle zu erhalten, wurde die Ultrastruktur der 3D-Gewebemodelle aufgeklärt sowie eine für den Lehrstuhl neue Methode, die Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie, die zur Analyse der ziliären Aktivität dient, etabliert. Da ein funktionaler gerichteter Zilienschlag nachgewiesen wurde, konnte die hohe *in vivo* Korrelation der generierten 3D-Atemwegstestsysteme bestätigt werden. Mit Hilfe dieser Methode wurde ebenfalls der Einfluss von isotoner Kochsalzlösung und des β 2-Sympatomimetikums Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz der primären Atemwegsmodelle untersucht und es konnte in beiden Fällen eine erhöhte CBF nachgewiesen werden.

Bisher wurden Gewebebiopsien der oberen Atemwege zur Zellisolation herangezogen. Um mögliche Erkrankungen der Gewebe auszuschließen und einen eventuellen Donormangel zu umgehen, wurde eine alternative Methode zur Isolation von respiratorischen Epithelzellen mittels nasaler Schleimhautabstriche am Lehrstuhl etabliert, der eine einfache und wiederholte Zellgewinnung, auch von gesunden Probanden, ermöglicht.

Bisherige Modellorganismen für die CF und die PCD bilden den jeweiligen Phänotyp nicht komplett ab. In dieser Arbeit stand die Generierung von personalisierten *in vitro* Krankheitsmodellen im Fokus, die zukünftig als individualisierte Testsysteme herangezogen werden könnten. Die CF-Modelle zeigten den der Krankheit spezifischen Phänotyp. Die Zellgewinnung mittels nasaler Schleimhautabstriche gewährleistete die Probengewinnung von PCD-Erkrankten, auch bereits im Kindesalter. In der vorliegenden Dissertation konnte für die PCD außerdem erstmalig die Generierung eines donorspezifischen Krankheitsmodells basierend auf der biologischen Matrix SIS gezeigt werden. Der Phänotyp der PCD-Modelle wurde mit Hilfe der HSV-M verifiziert und strukturelle ziliäre Defekte der PCD-Patienten konnten mit Hilfe von ultrastrukturellen Analysen bestätigt bzw. identifiziert werden. Zusätzlich sollte die Identifizierung eines spezifischen Biomarkers für die CF und die PCD mit Hilfe der Raman-Spektroskopie stattfinden, um einen potentiellen neuartigen diagnostischen Ansatz aufzudecken. Jedoch konnte in diesem Versuchsaufbau weder ein Biomarker für die CF noch für die PCD gefunden werden.

Zum Aufbau eines PCD-Modells, das die Untersuchung von Therapeutika, z. B. PTC124, für Patienten zugänglich macht, könnte eine PCD-Zelllinie generiert werden. Da Primär-

zellen jedoch für genetische Modifikationen aufgrund ihrer geringen Lebensdauer ungeeignet sind, wurden vier verschiedene Atemwegsepithelzelllinien (HBEC3-KT, Calu-3, VA10 und Cl-huAEC) in 3D auf deren mukoziliären Phänotyp und insbesondere auf deren ziliäre Funktionalität untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass lediglich die HBEC3-KT-Zelllinie in ziliärentragende Zellen differenzierte, jedoch die *in vivo* Situation, aufgrund der geringen Anzahl an Kinozilien und deren geringer Aktivität, nicht vollständig abbildet.

6.1 Charakterisierung von 3D-Atemwegstestsystemen

Eine kontinuierliche und standardisierte Verfügbarkeit von Spendergewebe kann nicht immer gewährleistet werden, wodurch nasale Schleimhautabstriche eine leicht verfügbare Alternative zu nasalen oder tracheobronchialen Gewebebiopsien darstellen. Ein Vorteil der Schleimhautabstriche gegenüber der Gewebebiopsien besteht darin, dass das Donormaterial gleichermaßen von gesunden Menschen sowie wiederholt gewonnen werden kann, wohingegen nasale oder tracheobronchiale Schleimhautresektate hauptsächlich während Operationen aus umliegenden Bereichen des zu entfernenden erkrankten Gewebes und in der Regel nur einmalig gewonnen werden können. Dadurch kann nicht gewährleistet werden, dass es sich bei dem Spendermaterial um komplett gesundes Gewebe handelt. Deshalb bestand eine Aufgabe dieser Dissertation darin, eine Methode zur Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen zu etablieren, um zum einen eine konstante Versorgung mit respiratorischen Epithelzellen zu garantieren und zum anderen mit hoher Wahrscheinlichkeit sicherzustellen, dass es sich bei den Proben nicht um erkranktes Gewebe handelt. Die durch diese Methode erhaltenen Epithelzellen können zum Aufbau von respiratorischen Mukosamodellen dienen, die in dieser Arbeit beispielsweise zur Etablierung der Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie und der Auswertung der ziliären Aktivität von 3D-Atemwegsmodellen herangezogen wurden. Bei der Zellgewinnung mittels nasalen Schleimhautabstrichen handelt es sich um eine Methode, die in der Klinik standardmäßig zum Einsatz kommt [155, 156]. Patientenmaterial kann einfach und ohne invasiven Eingriff bereits im Kindesalter gewonnen werden. Die einfache Probengewinnung im Kindesalter ermöglicht die Generierung eines Krankheitsmodells, mit Hilfe dessen eine frühzeitige maßgeschneiderte Therapie sichergestellt werden könnte. Mit der Etablierung dieser Methode und der Erstellung einer entsprechenden SOP (engl. *standard operation procedure*) eröffnet sich die Möglichkeit zur standardisierten Zellgewinnung. Jedoch ist hierbei anzumerken, dass anhand eines nasalen Schleimhautabstrichs lediglich nasale Epithelzellen und keine nasalen Fibroblasten isoliert werden können. Dies führt dazu,

6 Diskussion

dass zum Modellaufbau Fibroblasten eines weiteren Spenders oder aus einer entsprechenden Gewebebiopsie des gleichen Spenders herangezogen werden müssen. Somit besteht die Möglichkeit, dass das Gewebemodell nicht komplett das respiratorische Epithel eines Patienten widerspiegelt. Dies kann unter anderem bei der Identifizierung eines personalisierten Therapieansatzes dazu führen, dass die *in vitro* Situation die *in vivo* Situation nicht vollständig abbildet und die Therapie im Patienten nicht das gewünschte Ergebnis erzielt. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass Fibroblasten, unabhängig von deren Herkunft, einen positiven Einfluss auf die epitheliale Zelldifferenzierung im 3D-Atemwegsmodell hat [122, 157].

In 2D wurde der epitheliale Charakter von respiratorischen Primärzellen sowie von vier verschiedenen Atemwegsepithelzelllinien mittels CK14-Färbung untersucht. Es stellte sich heraus, dass weder die Zelllinie Calu-3 noch Cl-huAEC CK14 exprimierten. *Smirnova et al.* beschrieben, dass CK14-positive Zellen nicht in den distalen Atemwegen vorkommen [158]. Die Calu-3-Zelllinie stammt ursprünglich aus einem submukosalem Lungenadenokarzinom und bei Cl-huAEC ist der exakte Ursprung in den Atemwegen nicht geklärt. Um zu verifizieren, dass es sich bei der Cl-huAEC-Zelllinie tatsächlich um eine Zelllinie handelt, die die unteren Atemwege repräsentiert, müssen weitere Färbungen mit spezifischen Markern, z. B. dem *surfactant* Protein, durchgeführt werden.

Die Gewebemodelle, die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut wurden, basieren auf zwei unterschiedlichen Matrices: der biologischen Matrix SIS sowie der synthetischen PET-Membran. Bei der SIS handelt es sich um ein Teilstück der BioVaSc-TERM[®], welche ein Segment eines dezellularisierten Schweinedünndarms darstellt und das eine intakte Gefäßstruktur besitzt [159]. Diese Matrix bietet durch ihre Zusammensetzung viele Vorteile gegenüber der synthetischen PET-Membran. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen und Elastin [120, 148], wodurch sie den Zellen extrazelluläre Komponenten und eine komplexe Gewebearchitektur liefert. Dadurch sind Zelladhäsion, Proliferation sowie eine organisierte Anordnung und Zelldifferenzierung gewährleistet [110, 117, 118]. Dies ermöglicht die Generierung eines 3D-Gewebemodells mit hoher *in vivo* Korrelation. Da die Aufarbeitung der biologischen Matrix am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin jedoch von verschiedenen Personen per Hand durchgeführt wird, können die Matrices untereinander Varianzen aufweisen. Es ist keine komplette Standardisierung des Aufbereitungsprozesses gewährleistet, da die Mukosaschichten des Schweinejejunums in abweichender Form entfernt werden können. Dadurch können Zellen auf unterschiedlich aufbereiteten Matrices Diskrepanzen in der Zelladhäsion und/oder Zellanordnung aufzeigen. Die PET-Membran hat zwar den Nachteil, dass sie keine vergleichbare *in vivo*

6 Diskussion

Korrelation wie die biologische Matrix zeigt, jedoch ist es möglich den Modellaufbau auf der PET-Membran besser zu standardisieren. In den in dieser Arbeit generierten 3D-Atemwegstestsystemen konnte gezeigt werden, dass die Matrix keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung hat und die 3D-Gewebemodelle sowohl auf der biologischen, als auch der synthetischen Matrix in den mukoziliären Phänotyp differenzieren.

Wie bereits in vorherigen Publikationen unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, ist es möglich, 3D-Atemwegsgewebemodelle mit respiratorischen Primärzellen zu generieren [122, 147]. Primärzellen haben den Vorteil, natives und personalisiertes Gewebe zu repräsentieren [160]. Obwohl Primärzellen als die physiologisch relevantesten angesehen werden, weisen sie einige Nachteile auf. Sie sind zwar kommerziell erhältlich, aber teuer, zeigen eine geringe Lebensdauer und sind nicht standardisierbar. Es besteht eine Variabilität zwischen Spendern, Passagen oder Experimenten, zudem sind Primärzellen schwer transfizier- bzw. genetisch modifizierbar [161, 138]. Atemwegsepithelzelllinien stellen eine mögliche Alternative zu Primärzellen dar. Mit Hilfe von Zelllinien ist es zwar nicht möglich individuelle Krankheitsmodelle aufzubauen, jedoch sind Zelllinien gut verfügbar, liefern höhere Zellzahlen, eine erhöhte Lebensdauer und sind leichter zu kultivieren [160]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Zelllinien genetisch zu modifizieren und somit eine Krankheitszelllinie zu generieren, wie es bereits mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems für die CF gezeigt werden konnte [162]. Bei physiologisch relevanten 3D *in vitro* Testsystemen der Atemwege sind funktionale Kinozilien auf mindestens 60 % der Modelloberfläche notwendig [139], weshalb die vier Atemwegsepithelzelllinien HBEC3-KT, Calu-3, VA10 sowie Cl-huAEC hinsichtlich ihres mukoziliären Phänotyps mit besonderem Fokus auf deren ziliäre Funktionalität untersucht wurden.

Sowohl in der histomorphologischen und ultrastrukturellen Analyse als auch der Charakterisierung spezifischer Marker der Atemwege mittels IF konnte gezeigt werden, dass HBEC3-KT in den mukoziliären Phänotyp differenziert sind. Die Atemwegsepithelzelllinien Calu-3, VA10 und Cl-huAEC hingegen zeigten nur partielle Merkmale des Atemwegsepithels und keine Kinozilien auf der apikalen Modelloberfläche.

HBEC3-KT bildeten morphologisch den mukoziliären Phänotyp am besten ab, jedoch bedeckten funktionale kinozilientragende Zellen lediglich schätzungsweise 5 % der Modelloberfläche auf Gewebemodellen basierend auf der SIS. Bei der Kultivierung auf Transwellmembranen konnten keine funktionalen Kinozilien nachgewiesen werden. In vorherigen Studien konnte aber gezeigt werden, dass HBEC3-KT Zellen auf Transwell-Inserts bzw. Kollagengel in ziliärentragende Zellen differenzieren, jedoch gibt es keine Informationen über deren Anzahl und keinen Nachweis über deren Funktionalität [163, 141]. In elek-

6 Diskussion

tronenmikroskopischen Aufnahmen konnten in SIS-basierten HBEC3-KT-Modellen viele Mitochondrien nahe der epithelialen Oberfläche identifiziert werden. Diese gewährleisten in den humanen Atemwegen die Verfügbarkeit von ATP (Adenosintriphosphat) zur Unterstützung des Zilienschlags, der durch die motorische Aktivität des axonemalen Dyneins vermittelt wird [10]. Jedoch konnte in HBEC3-KT-basierten Atemwegsmodellen kein gerichteter Zilienschlag identifiziert werden.

Calu-3 bildete mehrschichtige Zellcluster auf der apikalen Seite der Modelle, die Muzine Muc5ac und Muc5b waren vorhanden und Mikrovilli sowie TJ konnten in der ultrastrukturellen Analyse identifiziert werden. In früheren Studien auf Transwell-Inserts konnten ähnliche morphologische Merkmale gezeigt werden [164, 165]. Bisher wurde die Calu-3 Zelllinie vor allem für Untersuchungen von TJ und Barriereformation herangezogen [166]. Calu-3 war die einzige Zelllinie, die kein CK5, sondern lediglich CK18 exprimierte, was darauf schließen lässt, dass diese keine vorläuferähnlichen Charakteristika beherbergt. In 3D-Gewebemodellen basierend auf der VA10 Zelllinie war eine plattenepithelähnliche Oberfläche zu erkennen, die TJ und lediglich Mikrovilli ausbildeten. Es konnten unorganisierte CK5-positive Basalzellen und CK18-positive differenzierte Epithelzellen verifiziert werden und eine geringe Menge an Mukus. *Benediktsdottir et al.* konnten zeigen, dass VA10 durchaus in der Lage sind auf Transwellmembranen in zilientragende Zellen zu differenzieren, die 10 - 15 % der Modelloberfläche bedeckten und eine Zilienschlagfrequenz von 6 - 7 Hz aufwiesen [140]. In dieser Arbeit ist es nicht gelungen, die Kulturbedingungen und den Modellaufbau mit Hilfe der biologischen Matrix soweit zu optimieren, dass zilientragendes Epithel entstand. Die Gewebemodelle mit Cl-huAEC wiesen die niedrigste *in vivo* Korrelation mit dem respiratorischen Epithel auf. Es konnten zwar TJ, Mikrovilli und CK5-positive Basal- sowie CK18-positive differenzierte Epithelzellen nachgewiesen werden, allerdings waren weder Kinozilien noch Muzine auf der epithelialen Oberfläche vorhanden. Cl-huAEC wären eine mögliche Zelllinie, um die unteren Atemwege zu repräsentieren. Dafür müssen spezifische Marker der unteren Atemwege, z.B. *surfactant* Proteine [167], verifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass HBEC3-KT zwar in funktionale kinozilientragende Zellen in der 3D-Zellkultur auf der biologischen Matrix differenzieren, diese sind aber nur auf schätzungsweise 5 % der Modelloberfläche präsent und zeigen keine normale Zilienschlagfrequenz, die in den gesunden Atemwegen zwischen 8 - 20 Hz liegt [56]. Dadurch ist HBEC3-KT keine geeignete Zelllinie, die die *in vivo* Situation komplett abbildet und zur Generierung einer PCD-Zelllinie mittels des CRISPR/Cas9-Systems herangezogen werden könnte.

6 Diskussion

Die nasalen sowie tracheobronchialen Primärmodelle auf der SIS oder der PET-Membran bildeten den mukoziliären Phänotyp aus. Gemäß *Schweinlin et al.* erfolgte deren Charakterisierung. Darüber hinaus fand eine detailliertere Analyse der Modelle statt. Neben funktionalen Kinozilien auf geschätzt 80 - 90 % der Modelloberfläche, waren TJ, eine Basallamina und spezifische Marker der Atemwege vorhanden. Nasale Modelle auf der SIS sowie tracheobronchiale Modelle auf der PET-Membran (MucilAir™) wiesen mehr Kinozilien auf, als nasale Modelle auf der PET-Membran bzw. tracheobronchiale auf der SIS. Dies könnte zum einen durch die donorabhängige Variabilität erklärbar sein [161], zum anderen handelt es sich bei den MucilAir™-Modellen um kommerziell erhältliche und standardisierte Atemwegsmodelle, die bereits seit langer Zeit für viele Studien der Atemwege verwendet werden und eine hohe Qualität aufweisen [168, 169].

Es wurde eine Methode zur Analyse der ziliären Aktivität entwickelt, die ergänzend zur histologischen bzw. immunhistologischen Charakterisierung von 3D-Atemwegsmodellen Aufschluss über die Funktionalität des Gewebemodells gibt. Da funktionale Kinozilien auf mindestens 60 % der Modelloberfläche notwendig sind [139], um ein Testsystem zu erhalten, das eine hohe *in vivo* Korrelation aufweist, bietet die etablierte Methode die Möglichkeit die Modelle entsprechend zu charakterisieren. Ebenfalls ist die Analyse des mukoziliären Transports gegeben, der gleichermaßen Informationen über die korrekte Ausrichtung des Zilienschlags liefert. Die ziliäre Motilität resultiert aus präzise gesteuerten Dyneinmotoren und dem mechanischen sowie chemischen Zusammenspiel von axonemalen strukturellen und enzymatischen Komponenten [170]. Die mukoziliäre Selbstreinigung erfordert, um den Transport von Fremdstoffen zu gewährleisten, die einheitliche Orientierung der Zilien einzelner sowie benachbarter Zellen und entlang der Gewebeachse [171]. Diese ist durch die planare Signalübertragung der Zellpolarität, die die Richtungsabhängigkeit spezifiziert und die respiratorischen Zilien orientiert, garantiert [171].

Während der funktionalen Analyse der 3D-Atemwegsmodelle wurde zur Equilibrierung der Frequenz eine Stabilisierungsphase von 30 Minuten festgelegt. Dies deckt sich mit anderen Studien, in welchen bereits gezeigt wurde, dass sich die CBF zunächst einpendeln muss, bevor die Substanzapplikation erfolgt [172].

Zusammengefasst wurde eine tracheobronchiale Zilienschlagfrequenz nachgewiesen, die sich auf der PET-Membran zwischen 8 - 12 Hz bzw. auf der SIS zwischen 12 - 14 Hz bewegte. Dies korreliert mit bereits durchgeführten Studien. *Liu et al.* berichteten beispielsweise über eine CBF von 9 - 10 Hz in tracheobronchialen 3D-Gewebemodellen auf der PET-Membran [173], wohingegen *Yager et al.* Werte im Bereich $14,7 \pm 1,16$ Hz in tracheobronchialen zilienträgenden Zellen nachweisen konnten [174]. In nasalen Gewebemodellen

6 Diskussion

auf der PET-Membran lag die Zilienschlagfrequenz zwischen 10 - 12 Hz, wohingegen diese auf der SIS 12 - 14 Hz betrug. *Ong et al.* beschrieb eine Zilienschlagfrequenz von $11,6 \pm 1,5$ Hz in nasalen 3D *air-liquid* Zellkulturen auf der PET-Membran [172], die mit den hier gezeigten Modellen korreliert.

Die Zilienschlagfrequenzanalyse der Primärmodelle zeigt Unterschiede zwischen nasalen und tracheobronchialen Modellen. Einige Studien besagen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen nasaler und tracheobronchialer Zilienschlagfrequenz besteht [175, 176]. Mögliche Unterschiede können aber dadurch erklärt werden, dass es sich bei den Spendern der nasalen Epithelzellen in den meisten Fällen um gesunde Donoren handelte, wohingegen die tracheobronchialen Gewebebiopsien von Patienten stammten, die an einem Tumor des respiratorischen Traktes litten. *Clary-Meinesz et al.* hingegen beschrieben, dass die CBF, je weiter distal man sich in den humanen Atemwegen befindet, abnimmt [177]. Obwohl die Trägerstruktur histomorphologisch keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung gezeigt hat, konnte in der CBF-Analyse ein Unterschied festgestellt werden. Die Epithelzellen des Donors 4 auf der SIS wurden ebenfalls zum Modellaufbau auf der synthetischen Matrix herangezogen (Spender 2). Hier konnte ein wesentlicher Unterschied identifiziert werden. Die CBF auf der biologischen Matrix war höher als auf der PET-Membran. Um zu verifizieren, dass tatsächlich die Matrix den Einfluss auf die CBF ausübt und nicht nur eine Varianz des Experiments bzw. der Passage vorliegt, müssten Experimente zukünftig mit mehreren Spendern wiederholt werden. In MucilAirTM Modellen wurde an Zeitpunkt 0 Minuten für alle drei Donoren eine höhere CBF ausgewertet, als in den darauffolgenden 30 Minuten. Dies lässt darauf schließen, dass hier keine Donorvariabilität vorliegt.

Um den Einfluss von 0,9 % NaCl-Lösung und Salbutamol auf die ziliäre Aktivität der Primärmodelle zu untersuchen, wurden diese mittels Aerosolgenerator appliziert. Dies zeigt eine hohe Übereinstimmung zu therapeutischen Maßnahmen, die in der Praxis über Inhalationssysteme verabreicht werden. Es konnte ein Einfluss der beiden vernebelten Substanzen 0,9 % NaCl-Lösung und Salbutamol auf die Zilienschlagfrequenz der Primärmodelle festgestellt werden. In Studien wurde gezeigt, dass die Zugabe von isotoner Kochsalzlösung eine Abnahme der Zilienschlagfrequenz um 46 % in kryokonservierter Schleimhaut der Nasennebenhöhlen bewirkt [178], wohingegen *Boon et al.* sowie *Min et al.* keine Änderung der ziliären Schlagfrequenz nach Zugabe von isotoner Kochsalzlösung beobachteten [179, 180]. In dieser Arbeit konnte allerdings ein leichter, tendenzieller Anstieg der CBF in beiden, nasalen und tracheobronchialen, Modellen nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Kochsalzlösung selbst als niedrig konzentrierte Lösung den

vorhandenen Mukus auf der Modelloberfläche löst, sodass die Kinozilien dadurch schneller schlagen können. Höher konzentrierte, hypertone Kochsalzlösung wird bei CF-Patienten routinemäßig als Inhalativum eingesetzt und verbessert den Schleimtransport [181]. Die Hypothese lautet, dass hypertone Kochsalzlösung eine anhaltende Zunahme des Volumens der periziliären Flüssigkeitsschicht bewirkt [182]. In einer Studie mit Patienten, die an chronischer Bronchitis litten, wurde gezeigt, dass im Vergleich zur 0,9 %igen Kochsalzlösung die hypertone Kochsalzlösung das Sputumgewicht und die Selbstreinigungsrate verdoppelte [183]. Möglicherweise zeigt die Kochsalzlösung in unserem Experiment einen konzentrationsunabhängigen Effekt, der in eine höhere CBF resultiert.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Zilienschlagfrequenz sowohl im nasalen als auch im tracheobronchialen Atemwegsmodell nach Salbutamolzugabe signifikant zunimmt. Die Frequenz nahm im nasalen Modell um knapp 24 % zu, wohingegen im tracheobronchialen Modell ein Anstieg von fast 21 % zu verzeichnen war. Dies korreliert mit früheren Studien, in denen nach Salbutamolinhalation *in vivo* ein signifikanter Anstieg der Zilienschlagfrequenz zu erkennen war [184] und die CBF *in vitro* um 17 % zunahm [179]. Salbutamol ist ein β 2-adrenerger Rezeptor Agonist [185] und findet als Bronchodilatator, vor allem bei Asthmapatienten, seinen Einsatz. Die Wirkung beruht auf der Aktivierung der Adenylatzyklase, wodurch die zyklische AMP (cAMP)-Synthese erhöht wird und eine Entspannung der glatten Bronchialmuskulatur resultiert [186]. cAMP gilt als möglicher Regulator der ziliären Aktivität des humanen Atemwegsepithels, was die erhöhte CBF nach Salbutamolgabe erklären könnte [187, 188].

Die in dieser Arbeit angewandte Substanzapplikation via Aerosolgenerator bildet die Praxis und den klinischen Alltag sehr gut ab. Dennoch gibt es viele Studien, die eine submerse Substanzzugabe favorisieren. Dies bietet zum Beispiel den Vorteil, reversible und irreversible Substanzeinflüsse zu untersuchen, indem die zu testende Substanz nach ihrer Wirkungsdauer durch frisches Medium oder Puffer ersetzt wird und die anschließende Veränderung des Zilienschlags analysiert werden kann. *Yaghi et al.* konnten zum Beispiel beweisen, dass ein reversibler Effekt nach Zugabe unterschiedlich konzentrierter Kochsalzlösungen besteht [189].

Eine effiziente mukoziliäre Selbstreinigung erfordert neben einem koordinierten Zilienschlag einer bestimmten Frequenz ebenfalls eine regulierte Muzinsynthese und Muzinsekretion [190]. Um Rückschlüsse auf die mukoziliäre Selbstreinigung ziehen zu können, wurde der mukoziliäre Transport von kugelförmigen Partikeln, sogenannten DynabeadsTM, in den 3D-Gewebemodellen der Atemwege untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese über einen gerichteten Zilienschlag sowohl über die Oberfläche der auf der SIS als auch

auf der PET-Membran basierenden Modelle transportiert werden. *Matsui et al.* berichteten über den mukoziliären Transport in 3D-Zellkulturen von humanen tracheobronchialen Epithelzellen auf der PET-Membran, der mit $84,2 \pm 11,2 \mu\text{m/s}$ [191] deutlich niedriger ist, als der in den hier gezeigten Modellen. Dennoch gehen einige der in dieser Arbeit bestimmten Werte der mukoziliären Transportgeschwindigkeit mit denen aus *in vivo* Studien konform, wo diese ab 4 mm/min bis über 20 mm/min (entspricht 67 - 333 $\mu\text{m/s}$) gemessen wurde [11]. Die hier dargestellten Modelle bieten den Vorteil einen gerichteten mukoziliären Transport über die gesamte Modelloberfläche zu zeigen, wohingegen in manchen Studien nur ein Transport in ausgewählten Feldern der Modelle beobachtet werden konnte und in denen keine allgemeine Transportrichtung erkennbar war [190].

6.2 Definierte Krankheitsmodelle

Im Zuge dieser Arbeit wurden personalisierte Krankheitsmodelle für die zwei seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie generiert und anschließend hinsichtlich ihres krankheitsspezifischen Phänotyps untersucht.

6.2.1 Zystische Fibrose

Zur Erstellung von CF-Krankheitsmodellen wurden die Epithelzellen von zwei CF-Spendern mit F508del Mutation herangezogen und Modelle auf der PET-Membran generiert bzw. die kommerziell erhältlichen CF-MucilAirTM Modelle der identischen Spender analysiert. Die HE-Färbung zeigte ein polarisiertes Epithel, elektronenmikroskopische Aufnahmen verifizierten Kinozilien auf der Modelloberfläche und ein funktionaler Zilienschlag konnte nachgewiesen werden. Es war eine hohe Anzahl an Becherzellen sowie Muc5ac-Expression, wobei es sich um eines der wichtigsten Muzine des respiratorischen Systems handelt [192], auffällig, wodurch die Modelle eine hohe Korrelation zum CF-Phänotyp zeigten [193]. In den CF-Modellen konnte ein funktionaler Zilienschlag identifiziert werden, deren Frequenz mit der der nicht-CF-MucilAirTM Modelle vergleichbar war. Normalerweise ist der Zilienschlag in CF-Patienten aufgrund des zähflüssigen Schleims verlangsamt [194], jedoch musste in diesem Versuchsansatz der Mukus weitestgehend gewaschen werden, weshalb sich die Zilienschlagfrequenz im Normalbereich befand. Da die Modelle zur Analyse des Zilienschlags bzw. des mukoziliären Transports in den Versuchsaufbau überführt werden mussten, bestand die Möglichkeit, dass der Mukus in Randbereichen oder sogar der gesamten Oberfläche nicht mehr vorhanden war. Dadurch konnte gezeigt werden, dass unterhalb der Schleimschicht ein gerichteter Zilienschlag ausgebildet war, wodurch bestätigt werden konnte, dass CF-Erkrankte nicht an einem Defekt des ziliären Apparats, sondern unter

6 Diskussion

einem defekten CFTR-Ionenkanal mit daraus resultierender hochviskoser Sekretbildung leiden [21]. In Transportstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Partikel nicht gerichtet, sondern unkoordiniert über die Modelloberfläche transportiert wurden oder sogar vollständig im Mukus festsaßen und kein weiterer Transport stattfand. Die Ursache hierfür ist der pathogonische zähflüssige Schleim sowie eine zu geringe periziliäre Flüssigkeitsschicht. Beides ist auf den Defekt des CFTR-Kanals in CF-Patienten zurückzuführen, der grundlegend für die unzureichende Chlorid- bzw. Bicarbonat-Sekretion ist [29].

Aufgrund der Vielfalt der CFTR-Mutationen und deren heterogenen Pathomechanismen sind Testsysteme notwendig, um potentielle neue und bestmöglich patientenspezifische Therapeutika zu entwickeln und anschließend zu testen. In CF-*knockout*-Mäusen konnte aufgrund der nicht auftretenden Lungenerkrankungen ein großer Unterschied zwischen murinem und humanem Phänotyp aufgedeckt werden, der auf einen alternativen Signalweg für den Chloridtransport in Mausepithelzellen zurückgeführt wurde [195]. Im Gegensatz zu Mäusen ist in Schweinen und Frettchen die Lungenarchitektur und -physiologie dem Menschen sehr ähnlich und im Tiermodell wurden für beide Spezies erfolgreiche CFTR-*knockouts* erreicht, die den humanen Phänotyp repräsentieren [131, 132]. Ebenso scheint die Pankreas-Destruktion beim neugeborenen CFTR^{-/-}-Frettchen der von CF-Säuglingen sehr ähnlich zu sein und deutlich weniger schwerwiegend als die ausgedehnte Destruktion des Pankreas bei neugeborenen CF-Schweinen [132]. Dennoch handelt es sich um Tiermodelle, die entsprechend des 3R-Prinzips vermieden werden möchten und die den Phänotyp des Menschen, beispielsweise aufgrund der Größe, nicht komplett abbilden können.

Da die Symptome der zystischen Fibrose in allen glandulären Epithelien, in denen CFTR stark exprimiert wird, vorkommen, gelten humane intestinale CF-Organoiden, die mit Hilfe des *swelling assays* die CFTR-Funktion beurteilen, bisher als potentielles humanes *in vitro* Modellsystem [123]. Allerdings sind respiratorische Symptome vorwiegend für die Mortalität der CF-Patienten verantwortlich [32], wodurch 3D *in vitro* Modelle, die die Atemwege von CF-Patienten abbilden, als besseres Testsystem für zukünftige Therapeutika gesehen werden können. Neben Enteroiden wurde die CFTR-Funktionalität ebenfalls in respiratorischen Organoiden bzw. Spheroïden untersucht [124, 125]. Jedoch bieten die in dieser Dissertation generierten CF-Testsysteme den Vorteil, mit hoher *in vivo* Korrelation den individuellen CF-Phänotyp abzubilden. Dadurch sind diese als 3D-Testsysteme geeignet und können ihren Einsatz insbesondere im Hinblick auf personalisierte Medizin finden.

6.2.2 Primäre Ziliendyskinesie

Zur Generierung von PCD-Modellen wurden die Epithelzellen von drei verschiedenen Spendern herangezogen. Alle drei PCD-Modelle zeigen in immunhistologischen sowie histologischen Färbungen typische morphologische Merkmale der humanen Atemwege. Es wurden sowohl spezifische respiratorische Zelltypen, wie CK5-positive Basalzellen und CK18-positive differenzierte Epithelzellen nachgewiesen, als auch die beiden wichtigsten Muzine des respiratorischen Systems [192], Muc5ac und Muc5b. Ebenfalls konnten Kinozilien auf der Modelloberfläche nachgewiesen werden, die sich aufgrund der fehlenden Motilität von denen der gesunden Modellen unterscheiden. Die ziliäre Funktion basiert auf den Dyneinarmkomplexen, die an den peripheren axonemalen A Mikrotubuli gebunden sind [196]. Die am häufigsten vorkommenden Anomalien bei PCD-Patienten umfassen das Fehlen der äußeren Dyneinarme. Diese Defekte verursachen eine vollständige oder nahezu vollständige Immotilität der Zilien [197]. Das DNAH5-Gen kodiert für die Dynein schwere Kette 5, den wichtigsten molekularen Motor der ODA [198] und es wurde gezeigt, dass Patienten, die eine DNAH5-Mutation tragen, ODA-Defekte aufweisen [79]. In der ultrastrukturellen Analyse der Zilienquerschnitte des Donors 1 konnten keine ODA nachgewiesen werden, wodurch die mit dem Genotyp assoziierte Strukturanomalie der Kinozilien des Patienten gezeigt werden konnte. Der Patient leidet an einer DNAH5-Mutation (IVS76+5G>A und IVS75-2A>T), woraus immotile Kinozilien resultieren, was ebenfalls in der Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie gezeigt werden konnte.

Die Genetik der zwei weiteren PCD-Patienten war nicht bekannt. In diagnostischen Tests an der Klinik konnte für Donor 2 das Protein DNAH5 weitestgehend als fehlerhaft bestätigt werden (persönliche Absprache mit Dr. med. Florian Segerer, Kinderklinik Würzburg). In Zilienquerschnitten der TEM-Analysen sind weder innere noch äußere Dyneinarme sichtbar. Bei kombinierten IDA- und ODA-Defekten handelt es sich um Mutationen, die folgende Gene betreffen: DYX1C1/DNAAF4 [199], SPAG1 [200], LRRC6 [201], KTU/DNAAF2 [202], LRRC50/DNAAF1 [203], C21ORF59 [204, 205], DNAAF3 [206], ZMYND10 [201], HEATR2/DNAAF5 [207] und PIH1D3 [208]. Es ist eine genetische Analyse erforderlich, um den genauen Gendefekt zu bestätigen.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zilienquerschnitte des Donors 3 konnten keine IDA nachgewiesen werden. Defekte, die IDA betreffen, sind in der Literatur jedoch entweder in Kombination mit ODA-Defekten oder mikrotubulärer Disorganisation beschrieben, wobei letztere in steifen Kinozilien mit hyperkinetischem Schlagmuster resultieren [198]. Mutationen, die diesen Phänotyp aufweisen, betreffen die Gene CCDC39 [209] bzw. CCDC40 [210]. Es muss in der Analyse weiterer Zilienquerschnitte geklärt werden,

ob es sich möglicherweise um einen der beiden kombinierten Defekte handeln kann. Finalen Aufschluss bietet aber, wie bereits erwähnt, lediglich die genetische Analyse.

Therapeutische Maßnahmen um die Ziliendysmotilität zu korrigieren und somit die mukoziliäre Selbstreinigung wiederherzustellen, sind derzeit noch nicht möglich. Gerade deshalb ist es wichtig, Testsysteme zu entwickeln, um potentielle individualisierte Therapeutika testen zu können. Es stehen zwar mehrere PCD-Tiermodelle zur Verfügung, jedoch repräsentiert keines den humanen Phänotyp [56]. *Mdnah5* (mouse DNAH5)-*knockout*-Mäuse, beispielsweise, zeigen neben den typischen PCD-Symptomen die Ausbildung eines Hydrocephalus [211]. Das Vorkommen von Hydrocephalus in PCD-Patienten ist selten, jedoch ist dieser ein häufiges Merkmal der Krankheit in Mausmodellen [212]. Dennoch dienten *Dnaic1-knockout*-Mäuse als Modellorganismus, in dem gezeigt werden konnte, dass die Gensatztherapie eine geeignete Behandlungsoption bei PCD-Patienten darstellen kann. Die ziliäre Funktion wurde mit Hilfe eines lentiviralen Vektors, der *Dnaic1* exprimiert, wiederhergestellt [137].

Humane Systeme stellen trotz allem die beste Option zur Entwicklung neuer Therapeutika dar. *Ahmed et al.* generierten eine PCD-Stammzelllinie eines Patienten mit *CCDC40*-Mutation [213]. Solche Zelllinien könnten zukünftig zum Aufbau von PCD-Modellen herangezogen werden, um gentherapeutische Ansätze im humanen System zu erforschen. Es konnte gezeigt werden, dass ein individualisiertes PCD-Modell basierend auf humanen Primärzellen generiert werden kann. Dieses Modell hat gegenüber allen bisherigen Modellsystemen den großen Vorteil, dass es, aufgrund der biologischen Matrix, den humanen Phänotyp sehr gut repräsentiert. Dadurch dass die Modelle eine wesentlich längere Lebensdauer aufweisen als beispielsweise Einzelzellkulturen aus nasalen Schleimhautabstrichen, können patientenspezifische Therapieansätze getestet werden.

6.3 Identifizierung eines Biomarkers mittels Raman-Spektroskopie für die seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie

Zur Identifizierung eines potentiellen Biomarkers, der für die beiden seltenen Erkrankungen CF und PCD einen neuartigen diagnostischen Ansatz hervorbringen könnte, wurden Patientenzellen und Atemwegsepithelzellen von nicht-CF bzw. PCD-Erkrankten als Kontrolle mittels nicht-invasiver Raman-Spektroskopie analysiert. Durch den hohen Spektralanteil der Zellen, stellt die Raman-Spektroskopie ein potentielles Diagnosewerkzeug

6 Diskussion

dar, wobei krankheitsassoziierte Moleküle sehr spezifische spektrale Eigenschaften aufweisen müssen, um zur Charakterisierung eines krankheitsspezifischen Biomarkers beizutragen [214]. Für eine zukünftige klinische Anwendung ist es notwendig, eine Spektralbibliothek bzw. Datenbank zu generieren, die aus allen aufgezeichneten Spektren von Patienten- und Kontrollproben besteht und die anschließend für ein zuverlässiges automatisiertes Screening unbekannter Proben verwendet werden kann. Die klinische Diagnostik könnte im Hinblick auf Zeit- und Kosteneinsparungen erheblich durch die Raman-Spektroskopie verbessert werden, wenn entsprechende diagnostische Veränderungen des Ramanspektrums der Patientenzellen identifiziert werden können.

Spezifische Molekularbindungen schwingen an bestimmten Wellenzahlen und jedes Molekül hat einen charakteristischen spektroskopischen Fingerabdruck [215], der in diesem Fall mit Hilfe von Mittelwertspektren und multivariater Datenanalyse identifiziert werden sollte. Die Zellen wurden in sogenannten Microwells analysiert, die die Untersuchung einer hohen Anzahl identisch präparierter Einzelzellen ermöglichen und aufgrund des fokussierten Lasers mit einer Messung pro Zelle eine hohe Menge an biochemischer Information liefern [216].

In der Hauptkomponentenanalyse konnte keine Auftrennung von CF- und Kontrollzellen gezeigt werden. Im Gegensatz zur CF war es bei PCD-Zellen möglich, diese von den Kontrollzellen zu unterscheiden. Allerdings war nur eine geringe Auftrennung sichtbar, die mittels linearer Diskriminanzanalyse mit einer Genauigkeit von 73,8 % vorhergesagt werden konnte. Laut *Gala de Pablo et al.* sind trotz des hohen Spektralanteils der Zellen die Unterschiede zwischen Zelltypen in der Regel sehr gering [214], was in den hier gezeigten Ergebnissen deutlich wird. Die für die Auftrennung relevanten Wellenzahlbereiche wurden mit Hilfe von *Movasaghi et al.* [154] identifiziert. Es waren drei Wellenzahlbereiche für deren Auftrennung relevant: 848 - 862 cm^{-1} , 1316 - 1324 cm^{-1} und 1458 - 1467 cm^{-1} . Der Wellenzahlbereich 848 - 862 cm^{-1} ist spezifisch für Dehnungsschwingungen der Einfachbindungen von Aminosäuren und Polysaccharide. Bei der Wellenzahl 860 cm^{-1} wurden Phosphatgruppen nachgewiesen. Die Auftrennung der Messdaten bei 1320 cm^{-1} lässt sich auf das Vorhandensein von Guanin (DNA/RNA) zurückführen. Bei 1322 cm^{-1} sind Deformationsschwingungen von Kollagen und Nukleinsäuren für die Auftrennung relevant. Die Wellenzahlen 1458 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} repräsentieren den Nukleinsäuregehalt im Gewebe und CH_2/CH_3 Deformationen von Lipiden und Kollagen.

Zur Verbesserung der Analyse und um möglicherweise eine Auftrennung mit einer höheren Vorhersagewahrscheinlichkeit zu erreichen, ist es notwendig, mehrere Spender in die Messungen miteinzubeziehen und die Messungen vieler Zellen an verschiedenen Tagen

6 Diskussion

durchzuführen, um z. B. den Einfluss des Messtages auszuschließen. Es wurde gezeigt, dass die Messtage keinen Einfluss auf die gruppenspezifische Auftrennung in den Experimenten mit CF- als auch mit PCD-Zellen hatten.

Es wurde bereits berichtet, dass sich der Einsatz eines 785 nm Raman-Lasers am besten für die Analyse biologischer Proben, vor allem lebender Zellen, eignet [217]. Zukünftig könnte die Laserleistung erhöht werden, wodurch die Raman-Spektroskopie sensitiver würde. Allerdings würden lebende Zellen eine höhere Laserleistung nicht überleben und diese müssten vorher fixiert werden, was dem diagnostischen Ansatz widersprechen würde.

Es besteht die Notwendigkeit einer verbesserten Früherkennung der Erkrankungen mit hoher Sensitivität und Spezifität, die zum frühen Einsatz der Therapiemaßnahmen führen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Unterschiede in Ramanspektren zwischen Tumor- und Nicht-Tumorgewebe bestehen [218]. Die Raman-Spektroskopie liefert demnach das Potential, neuartige Biomarker aufzudecken, die ein schnelles und genaues Screening der Krankheitsanfälligkeit sowie des Krankheitsbeginns ermöglicht.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin neue Methode zur Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen als neue standardisierte Zellquelle zur Generierung von 3D-Atemwegstestsystemen eingeführt werden. Diese Methode eignete sich gleichermaßen als Probenahme von PCD-Patienten auch bereits im Kindesalter und gewährleistet eine zukünftige repetitive Zellgewinnung. Des Weiteren konnte die Methode der Hochgeschwindigkeitsvideomikroskopie etabliert werden, mit der es möglich ist, die ziliäre Aktivität hinsichtlich der Zilienschlagfrequenz und des ziliären Transports der 3D-Atemwegstestsysteme zu analysieren und somit eine hohe *in vitro in vivo* Korrelation zu bestätigen. Bei der Analyse der Atemwegsepithelzelllinien HBEC3-KT, Calu-3, VA10 und Cl-huAEC hat sich keine als potentielle Alternative zu nasalen bzw. tracheobronchialen Primärzellen herausgestellt, da lediglich HBEC3-KT-Zellen in ziliärentragende Zellen, die jedoch keinen funktionalen Zilienschlag aufwiesen, differenzierten und den humanen Phänotyp dadurch nicht komplett abbildeten. Obwohl sich in dieser Arbeit keine Zelllinie als Alternative zu Primärzellen herausgestellt hat, besteht die Möglichkeit, weitere Atemwegsepithelzelllinien auf deren mukoziliären Phänotyp zu untersuchen. Eine Atemwegszelllinie, die die *in vivo* Situation vollständig repräsentiert, stellt die Grundlage zur Generierung von spezifischen Krankheitszelllinien, beispielsweise einer PCD-Zelllinie, mittels des CRISPR/Cas9-Systems. Durch das *Tissue Engineering* konnten patientenspezifische 3D-Atemwegstestsysteme für die beiden seltenen Erkrankungen zystische Fibrose und primäre Ziliendyskinesie entwickelt werden. Die entsprechenden Phänotypen konnten mittels histologischer Analysen, der Charakterisierung spezifischer Marker, elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Modelloberfläche bzw. der Zilienquerschnitte sowie der Analyse der ziliären Funktionalität verifiziert werden. Vor allem hinsichtlich der PCD-Modelle ist es erstmalig gelungen, ein donorspezifisches 3D-Krankheitsmodell auf einer biologischen Matrix zu etablieren. Zukünftig eignen sich beide Krankheitsmodelle, vor allem im Hinblick auf die personalisierte Medizin, als Testsysteme potentieller Therapeutika. Zusätzlich ist es möglich, das individualisierte Ansprechen auf CFTR-Modulatoren für CF oder den Einsatz von PTCs für PCD zu identifizieren. Die entwickelten Testsysteme liefern zusätzlich die Möglichkeit, Grundlagenforschung zu betreiben, um die Pathogenese auf biochemischer Ebene noch besser zu verstehen. Zur Modelloptimierung könnten Bioreaktorsysteme, die eine kontinuierliche Nährstoffversorgung gewährleisten, ihren Einsatz finden. Des Weiteren könnten Zelltypen, wie z. B. Immunzellen, das Testsystem komplexer machen, um eine noch höhere *in vivo* Korrelation zu garantieren.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In ersten Folgearbeiten konnte der Einsatz von sogenannten Himbeerpartikeln, die am Fraunhofer ISC synthetisiert wurden, getestet werden, die via Aerosolgenerator auf Atemwegsepithelzellen in 2D bzw. 3D appliziert wurden. Zukünftig sollen die Partikel verschiedene Kompartimente besitzen, in denen sich unterschiedliche Wirkstoffe, z. B. Mukolytika, befinden, die lokal wirken und somit eine potentielle neue kombinierte Wirkstofftherapie zur Verfügung stellen. Es wurde der Vergleich zwischen dem praxisnahen Inhalationssystem und submerser Zugabe der Partikel durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass diese in beiden Fällen nicht direkt mit den Zellen interagieren oder über die Zellmembran in diese eindringen. Es konnte in Experimenten mit 3D-Gewebemodellen aufgedeckt werden, dass die Partikel keinen zytotoxischen Effekt besitzen. In zukünftigen Studien muss die Interaktion dieser Partikel mit den Zellen in 3D intensiver erforscht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] XM Bustamante-Marin und LE Ostrowski. “Cilia and mucociliary clearance”. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9.4 (2017), a028241.
- [2] J Schwegler und R Lucius. *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. 6. Aufl. Thieme, 2016.
- [3] D Bösch. *Lunge und Atemwege*. Springer, 2014.
- [4] W Graumann und D Sasse. *Anatomie Band 3 Innere Organsysteme*. Schattauer, 2004.
- [5] R Hamed und J Fiegel. “Synthetic tracheal mucus with native rheological and surface tension properties”. In: *Journal of biomedical materials research Part A* 102.6 (2014), S. 1788–1798.
- [6] M C Rose und JA Voynow. “Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease”. In: *Physiological reviews* 86.1 (2006), S. 245–278.
- [7] A Beule. “Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses”. In: *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery* 9 (2010).
- [8] M Meeks und A Bush. “Primary ciliary dyskinesia (PCD)”. In: *Pediatric pulmonology* 29.4 (2000), S. 307–316.
- [9] EL Rawlins und B Hogan. “Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung”. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295.1 (2008), S. L231–L234.
- [10] M Kikkawa. “Big steps toward erstanding dynein”. In: *J Cell Biol* 202.1 (2013), S. 15–23.
- [11] A Wanner, M Salathé und TG O’Riordan. “Mucociliary clearance in the airways.” In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 154.6 (1996), S. 1868–1902.
- [12] T Heuser u. a. “The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella”. In: *The Journal of cell biology* 187.6 (2009), S. 921–933.
- [13] M Pavelka und J Roth. *Funcional Ultrastructure, Atlas of Tissue Biology and Pathology*. 2. Aufl. SpringerWienNewYork, 2014.

Literaturverzeichnis

- [14] ELF Holzbaur und RB Vallee. “Dyneins: molecular structure and cellular function”. In: *Annual review of cell biology* 10.1 (1994), S. 339–372.
- [15] CJ Brokaw und R Kamiya. “Bending patterns of Chlamydomonas flagella: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function”. In: *Cell motility and the cytoskeleton* 8.1 (1987), S. 68–75.
- [16] MJ Sanderson und MA Sleight. “Serum proteins agglutinate cilia and modify ciliary coordination”. In: *Pediatric research* 15.3 (1981), S. 219.
- [17] P Satir. “Structural basis of ciliary movement.” In: *Environmental health perspectives* 35 (1980), S. 77–82.
- [18] W Hofmann und B Asgharian. “The effect of lung structure on mucociliary clearance and particle retention in human and rat lungs”. In: *Toxicological Sciences* 73.2 (2003), S. 448–456.
- [19] P Satir und ST Christensen. “Overview of structure and function of mammalian cilia”. In: *Annu. Rev. Physiol.* 69 (2007), S. 377–400.
- [20] *Bundesministerium für Gesundheit*. <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltene-erkrankungen.html>. Accessed: 15.07.2019, 11:40 Uhr.
- [21] J Rommens u. a. “Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping”. In: *Science* 245.4922 (1989), S. 1059–1065.
- [22] *Orphanet*. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=586. Accessed: 15.07.2019, 13:28 Uhr.
- [23] DH Andersen. “Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study”. In: *American journal of Diseases of Children* 56.2 (1938), S. 344–399.
- [24] BS Quon und SM Rowe. “New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis”. In: *Bmj* 352 (2016), S. i859.
- [25] MJ Welsh und AE Smith. “Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis”. In: *Cell* 73.7 (1993), S. 1251–1254.
- [26] MA Mall und D Hartl. *CFTR: cystic fibrosis and beyond*. 2014.
- [27] DC Gadsby, P Vergani und L Csanády. “The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis”. In: *Nature* 440.7083 (2006), S. 477.

Literaturverzeichnis

- [28] JR Riordan. “CFTR function and prospects for therapy”. In: *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008), S. 701–726.
- [29] RC Boucher. “Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration”. In: *Trends in molecular medicine* 13.6 (2007), S. 231–240.
- [30] RD Coakley u. a. “Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.26 (2003), S. 16083–16088.
- [31] AA Pezzulo u. a. “Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung”. In: *Nature* 487.7405 (2012), S. 109.
- [32] F Ratjen u. a. “Cystic fibrosis”. In: *Nat Rev Dis Primers* 1 (2015), S. 15010.
- [33] B Button u. a. “A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia”. In: *Science* 337.6097 (2012), S. 937–941.
- [34] BJ Rosenstein, GR Cutting u. a. “The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement”. In: *The Journal of pediatrics* 132.4 (1998), S. 589–595.
- [35] M Lopes-Pacheco. “CFTR modulators: shedding light on precision medicine for cystic fibrosis”. In: *Frontiers in pharmacology* 7 (2016), S. 275.
- [36] MN Bronstein u. a. “Pancreatic insufficiency, growth, and nutrition in infants identified by newborn screening as having cystic fibrosis”. In: *The Journal of pediatrics* 120.4 (1992), S. 533–540.
- [37] WB Guggino und SP Banks-Schlegel. “Macromolecular interactions and ion transport in cystic fibrosis”. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 170.7 (2004), S. 815–820.
- [38] R Kraemer und M Kistler. *Cystische Fibrose/Mukoviszidose, Praktische Hilfe für Betroffene*. Springer Basel AG, 1992.
- [39] H Lindemann, B Tümmler und G Dockter. *Mukoviszidose - Zystische Fibrose*. 4. Aufl. Georg Thieme Verlag KG, 2004.
- [40] MF Servidoni u. a. “Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil”. In: *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 43.2 (2017), S. 121–128.
- [41] A Mishra, R Greaves und J Massie. “The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era”. In: *The Clinical biochemist. Reviews/Australian Association of Clinical Biochemists*. 26.4 (2005), S. 135.

Literaturverzeichnis

- [42] *CFTR mutations database*. <http://www.gerret.sickkids.on.ca/cftrncgi-bin/FullTable>. Accessed: 15.07.2019, 17:56 Uhr.
- [43] N Morral u. a. “The origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in European populations”. In: *Nature genetics* 7.2 (1994), S. 169.
- [44] EK Schneider u. a. “Drug–drug plasma protein binding interactions of ivacaftor”. In: *Journal of Molecular Recognition* 28.6 (2015), S. 339–348.
- [45] SH Cheng u. a. “Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis”. In: *Cell* 63.4 (1990), S. 827–834.
- [46] MA Mall und LJV Galiotta. “Targeting ion channels in cystic fibrosis”. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 14.5 (2015), S. 561–570.
- [47] S Kim und WR Skach. “Mechanisms of CFTR folding at the endoplasmic reticulum”. In: *Frontiers in pharmacology* 3 (2012), S. 201.
- [48] *know-your-mutation*. <https://www.cff.org/Care/Clinician-Resources/Network-News/August-2017/Know-Your-CFTR-Mutations.pdf>. Accessed: 15.07.2019, 18:29 Uhr.
- [49] P Burgel u. a. “Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries”. In: *European Respiratory Journal* 46.1 (2015), S. 133–141.
- [50] M Cohen-Cymbarknoh, D Shoseyov und E Kerem. “Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life”. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 183.11 (2011), S. 1463–1471.
- [51] DM Orenstein, GB Winnie und H Altman. “Cystic fibrosis: a 2002 update”. In: *The Journal of pediatrics* 140.2 (2002), S. 156–164.
- [52] MO Henke und F Ratjen. “Mucolytics in cystic fibrosis”. In: *Paediatric respiratory reviews* 8.1 (2007), S. 24–29.
- [53] S Shak u. a. “Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum.” In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.23 (1990), S. 9188–9192.
- [54] MM Rafeeq und HAS Murad. “Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches”. In: *Journal of translational medicine* 15.1 (2017), S. 84.
- [55] MA Chilvers, A Rutman und C O’Callaghan. “Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia”. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112.3 (2003), S. 518–524.

Literaturverzeichnis

- [56] MW Leigh u. a. “Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome”. In: *Genetics in Medicine* 11.7 (2009), S. 473.
- [57] CE Kuehni u. a. *Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children*. 2010.
- [58] JS Lucas u. a. “Primary ciliary dyskinesia”. In: *Orphan Lung Diseases. Eur Respir Monogr* 54 (2011), S. 201–217.
- [59] AK Siewert. “Ueber einen Fall van Bronchiectasie bei einem patienten mito Situs inversus viscerum”. In: *Berlin Klin Wochen schr* 6 (1904), S. 139–141.
- [60] M Kartagener. “Zur pathogenese der bronchiektasien”. In: *Beiträge zur Klinik der Tuberkulose and spezifischen Tuberkulose-Forschung* 84.1-2 (1933), S. 73–85.
- [61] BA Afzelius. “A human syndrome caused by immotile cilia”. In: *Science* 193.4250 (1976), S. 317–319.
- [62] A Bush u. a. “Primary ciliary dyskinesia: current state of the art”. In: *Archives of disease in childhood* 92.12 (2007), S. 1136–1140.
- [63] M Canciani u. a. “The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary ciliary dyskinesia”. In: *Pediatric pulmonology* 5.4 (1988), S. 210–214.
- [64] R Corbelli u. a. “Nasal nitric oxide measurements to screen children for primary ciliary dyskinesia”. In: *Chest* 126.4 (2004), S. 1054–1059.
- [65] A Barbato u. a. “Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children”. In: *European Respiratory Journal* 34.6 (2009), S. 1264–1276.
- [66] B Karadag u. a. “Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia”. In: *European Respiratory Journal* 13.6 (1999), S. 1402–1405.
- [67] JO Landberg u. a. “Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener’s syndrome”. In: *European Respiratory Journal* 7.8 (1994), S. 1501–1504.
- [68] K Alving, E Weitzberg und JM Landberg. “Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics”. In: *European Respiratory Journal* 6.9 (1993), S. 1368–1370.
- [69] WT Walker u. a. “Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia”. In: *European Respiratory Journal* 40.4 (2012), S. 1024–1032.

Literaturverzeichnis

- [70] IM Balfour-Lynn, A Lavery und R Dinwiddie. “Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis.” In: *Archives of Disease in Childhood* 75.4 (1996), S. 319–322.
- [71] S Lindberg, AC And und T Runer. “Nitric oxide (NO) production in the upper airways is decreased in chronic sinusitis”. In: *Acta oto-laryngologica* 117.1 (1997), S. 113–117.
- [72] C Werner, JG Onnebrink und H Omran. “Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia”. In: *Cilia* 4.1 (2015), S. 2.
- [73] GW Dougherty u. a. “DNAH11 localization in the proximal region of respiratory cilia defines distinct outer dynein arm complexes”. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 55.2 (2016), S. 213–224.
- [74] K Schütze, E Lorbach und S Koch. “Novel cell analysis based on Raman spectroscopy”. In: *Laser World Photon*. 2013 (2013).
- [75] AJ Shapiro u. a. “Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review”. In: *Pediatric pulmonology* 51.2 (2016), S. 115–132.
- [76] MR Knowles u. a. “Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease”. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 188.8 (2013), S. 913–922.
- [77] A Horani und TW Ferkol. “Advances in the genetics of primary ciliary dyskinesia: clinical implications”. In: *Chest* 154.3 (2018), S. 645–652.
- [78] G Pennarun u. a. “Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia”. In: *The American Journal of Human Genetics* 65.6 (1999), S. 1508–1519.
- [79] H Olbrich u. a. “Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left–right asymmetry”. In: *Nature genetics* 30.2 (2002), S. 143.
- [80] GC Schwabe u. a. “Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations”. In: *Human mutation* 29.2 (2008), S. 289–298.
- [81] VH Castleman u. a. “Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities”. In: *The American Journal of Human Genetics* 84.2 (2009), S. 197–209.

Literaturverzeichnis

- [82] B Rubbo und JS Lucas. “Clinical care for primary ciliary dyskinesia: current challenges and future directions”. In: *European Respiratory Review* 26.145 (2017), S. 170023.
- [83] JS Lucas u. a. “Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia”. In: *Archives of disease in childhood* 99.9 (2014), S. 850–856.
- [84] WD Bennett. “Effect of β -adrenergic agonists on mucociliary clearance”. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110.6 (2002), S291–S297.
- [85] M Lai u. a. “Gene editing of DNAH11 restores normal cilia motility in primary ciliary dyskinesia”. In: *Journal of medical genetics* 53.4 (2016), S. 242–249.
- [86] A Agusti u. a. “Treatable traits: toward precision medicine of chronic airway diseases”. In: *European Respiratory Journal* 47.2 (2016), S. 410–419.
- [87] R Langreth und M Waldholz. “New era of personalized medicine targeting drugs for each unique genetic profile”. In: *The oncologist* 4.5 (1999), S. 426–427.
- [88] JL Jameson und DL Longo. “Precision medicine—personalized, problematic, and promising”. In: *Obstetrical & gynecological survey* 70.10 (2015), S. 612–614.
- [89] SM Paranjape und PJ Mogayzel Jr. “Cystic fibrosis in the era of precision medicine”. In: *Paediatric respiratory reviews* 25 (2018), S. 64–72.
- [90] BW Ramsey u. a. “A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation”. In: *New England Journal of Medicine* 365.18 (2011), S. 1663–1672.
- [91] JC Davies u. a. “Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation”. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 187.11 (2013), S. 1219–1225.
- [92] F Van Goor u. a. “Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.44 (2009), S. 18825–18830.
- [93] F Van Goor u. a. “Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.46 (2011), S. 18843–18848.
- [94] CE Wainwright u. a. “Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR”. In: *New England Journal of Medicine* 373.3 (2015), S. 220–231.

Literaturverzeichnis

- [95] PA Flume u. a. “Cystic fibrosis pulmonary guidelines: airway clearance therapies”. In: *Respiratory care* 54.4 (2009), S. 522–537.
- [96] EK Schneider-Futschik. “Beyond cystic fibrosis transmembrane conductance regulator therapy: a perspective on gene therapy and small molecule treatment for cystic fibrosis.” In: *Gene therapy* (2019).
- [97] J Zabner u. a. “Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis”. In: *Cell* 75.2 (1993), S. 207–216.
- [98] AC Fischer u. a. “Expression of a truncated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an AAV5-pseudotyped vector in primates”. In: *Molecular Therapy* 15.4 (2007), S. 756–763.
- [99] AG Stocker u. a. “Single-dose lentiviral gene transfer for lifetime airway gene expression”. In: *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications* 11.10 (2009), S. 861–867.
- [100] EFWW Alton u. a. “Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial”. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 3.9 (2015), S. 684–691.
- [101] I Amirav u. a. “Primary ciliary dyskinesia: prospects for new therapies, building on the experience in cystic fibrosis”. In: *Paediatric respiratory reviews* 10.2 (2009), S. 58–62.
- [102] E Kerem u. a. “41* PTC124 activity in CF patients carrying stop mutations: results of a phase 2 study”. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 6 (2007), S10.
- [103] JA Holbrook u. a. “Nonsense-mediated decay approaches the clinic”. In: *Nature genetics* 36.8 (2004), S. 801.
- [104] DM Bedwell u. a. “Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line”. In: *Nature medicine* 3.11 (1997), S. 1280.
- [105] M Wilschanski u. a. “A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations”. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 161.3 (2000), S. 860–865.
- [106] A Bush u. a. “Mucus properties in children with primary ciliary dyskinesia: comparison with cystic fibrosis”. In: *Chest* 129.1 (2006), S. 118–123.

Literaturverzeichnis

- [107] Z Bukowy-Bieryllo u. a. “Aminoglycoside-stimulated readthrough of premature termination codons in selected genes involved in primary ciliary dyskinesia”. In: *RNA biology* 13.10 (2016), S. 1041–1050.
- [108] K Nagel-Wolfrum u. a. “Targeting nonsense mutations in diseases with translational read-through-inducing drugs (TRIDs)”. In: *BioDrugs* 30.2 (2016), S. 49–74.
- [109] R Langer und JP Vacanti. “Tissue Engineering”. In: *Science* 260.5110 (1993), S. 920–926.
- [110] JP Vacanti und R Langer. “Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation”. In: *The lancet* 354 (1999), S32–S34.
- [111] P Poand und M Ritskes-Hoitinga. “Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail”. In: *Journal of translational medicine* 16.1 (2018), S. 1–8.
- [112] *Bundesinstitut für Risikobewertung*. https://www.bfr.bund.de/de/3r_prinzip-193970.html. Accessed: 22.07.2019, 12:37 Uhr.
- [113] J Schanz u. a. “Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research”. In: *Journal of biotechnology* 148.1 (2010), S. 56–63.
- [114] WMS Russell, RL Burch und CW Hume. *The principles of humane experimental technique*. Bd. 238. Methuen London, 1959.
- [115] K Schenke-Layland und H Walles. “Strategies in tissue engineering and regenerative medicine”. In: *Biotechnology journal* 8.3 (2013), S. 278–279.
- [116] FJ O’Brien. “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering”. In: *Materials today* 14.3 (2011), S. 88–95.
- [117] PX Ma. “Biomimetic materials for tissue engineering”. In: *Advanced drug delivery reviews* 60.2 (2008), S. 184–198.
- [118] SF Badylak, D Taylor und K Uygun. “Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds”. In: *Annual review of biomedical engineering* 13 (2011), S. 27–53.
- [119] A Gilpin und Y Yang. “Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications”. In: *BioMed research international* 2017 (2017).

Literaturverzeichnis

- [120] H Mertsching u. a. “Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue”. In: *Transplantation* 88.2 (2009), S. 203–210.
- [121] M Schweinlin u. a. “Human barrier models for the in vitro assessment of drug delivery”. In: *Drug delivery and translational research* 7.2 (2017), S. 217–227.
- [122] M Steinke u. a. “An engineered 3D human airway mucosa model based on an SIS scaffold”. In: *Biomaterials* 35.26 (2014), S. 7355–7362.
- [123] JF Dekkers u. a. “A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids”. In: *Nature medicine* 19.7 (2013), S. 939.
- [124] JJ Brewington u. a. “Detection of CFTR function and modulation in primary human nasal cell spheroids”. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 17.1 (2018), S. 26–33.
- [125] N Sachs u. a. “Long-term expanding human airway organoids for disease modeling”. In: *The EMBO Journal* 38.4 (2019).
- [126] S Simsek u. a. “Modeling cystic fibrosis using pluripotent stem cell-derived human pancreatic ductal epithelial cells”. In: *Stem Cells Translational Medicine* 5.5 (2016), S. 572–579.
- [127] JN Snouwaert u. a. “An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting”. In: *Science* 257.5073 (1992), S. 1083–1088.
- [128] WH Colledge u. a. “Generation and characterization of a Δ F508 cystic fibrosis mouse model”. In: *Nature genetics* 10.4 (1995), S. 445.
- [129] MA Mall. “Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models”. In: *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 21.1 (2008), S. 13–24.
- [130] BR Grubb und RC Boucher. “Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis”. In: *Physiological reviews* 79.1 (1999), S193–S214.
- [131] CS Rogers u. a. “Production of CFTR-null and CFTR- Δ F508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer”. In: *The Journal of clinical investigation* 118.4 (2008), S. 1571–1577.
- [132] X Sun u. a. “Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis”. In: *The Journal of clinical investigation* 120.9 (2010), S. 3149–3160.
- [133] Z Carvalho-Santos u. a. “Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella”. In: *J Cell Biol* 194.2 (2011), S. 165–175.

Literaturverzeichnis

- [134] Takashi Ishikawa. “Axoneme structure from motile cilia”. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9.1 (2017), a028076.
- [135] J Mianné u. a. “Induced Pluripotent Stem Cells for Primary Ciliary Dyskinesia Modeling and Personalized Medicine”. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 59.6 (2018), S. 672–683.
- [136] LE Ostrowski u. a. “Conditional deletion of *dnaic1* in a murine model of primary ciliary dyskinesia causes chronic rhinosinusitis”. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 43.1 (2010), S. 55–63.
- [137] LE Ostrowski u. a. “Restoring ciliary function to differentiated primary ciliary dyskinesia cells with a lentiviral vector”. In: *Gene therapy* 21.3 (2014), S. 253.
- [138] JH Widdicombe u. a. “Expansion of cultures of human tracheal epithelium with maintenance of differentiated structure and function”. In: *Biotechniques* 39.2 (2005), S. 249–255.
- [139] L Feriani u. a. “Assessing the collective dynamics of motile cilia in cultures of human airway cells by multiscale DDM”. In: *Biophysical journal* 113.1 (2017), S. 109–119.
- [140] BE Benediktsdóttir u. a. “Drug delivery characteristics of the progenitor bronchial epithelial cell line VA10”. In: *Pharmaceutical research* 30.3 (2013), S. 781–791.
- [141] MB Vaughan u. a. “A three-dimensional model of differentiation of immortalized human bronchial epithelial cells”. In: *Differentiation* 74.4 (2006), S. 141–148.
- [142] AP Wong u. a. “Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein”. In: *Nature biotechnology* 30.9 (2012), S. 876.
- [143] BAS McIntyre u. a. “Expansive generation of functional airway epithelium from human embryonic stem cells”. In: *Stem cells translational medicine* 3.1 (2014), S. 7–17.
- [144] S Konishi u. a. “Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells”. In: *Stem Cell Reports* 6.1 (2016), S. 18–25.
- [145] AL Firth u. a. “Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.17 (2014), E1723–E1730.

Literaturverzeichnis

- [146] JK Marthin u. a. “Patient-specific three-dimensional explant spheroids derived from human nasal airway epithelium: a simple methodological approach for ex vivo studies of primary ciliary dyskinesia”. In: *Cilia* 6.1 (2017), S. 3.
- [147] N Lodes. “Establishment and standardisation of a 3D *in vitro* tissue model of the human nasal mucosa”. Masterarbeit. Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg, 2015.
- [148] D Schultheiss u. a. “Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model”. In: *The Journal of urology* 173.1 (2005), S. 276–280.
- [149] K Linke u. a. “Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research”. In: *Tissue engineering* 13.11 (2007), S. 2699–2707.
- [150] CF Clary-Meinesz u. a. “Temperature effect on the ciliary beat frequency of human nasal and tracheal ciliated cells”. In: *Biology of the Cell* 76.3 (1992), S. 335–338.
- [151] K Prüfert, A Vogel und G Krohne. “The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth”. In: *Journal of cell science* 117.25 (2004), S. 6105–6116.
- [152] C Matthäus u. a. “Infrared and Raman microscopy in cell biology”. In: *Methods in cell biology* 89 (2008), S. 275–308.
- [153] A Marel u. a. “Arraying Cell Cultures Using PEG-DMA Micromolding in Standard Culture Dishes”. In: *Macromolecular bioscience* 13.5 (2013), S. 595–602.
- [154] Z Movasaghi, S Rehman und I Rehman. “Raman spectroscopy of biological tissues”. In: *Applied Spectroscopy Reviews* 42.5 (2007), S. 493–541.
- [155] J Rutland und PJ Cole. “Nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency in cystic fibrosis compared with sinusitis and bronchiectasis.” In: *Thorax* 36.9 (1981), S. 654–658.
- [156] MA Chilvers und C O’Callaghan. “Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods”. In: *Thorax* 55.4 (2000), S. 314–317.
- [157] MM Myerburg u. a. “Hepatocyte growth factor and other fibroblast secretions modulate the phenotype of human bronchial epithelial cells”. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 292.6 (2007), S. L1352–L1360.
- [158] NF Smirnova u. a. “Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs”. In: *Respiratory research* 17.1 (2016), S. 83.

Literaturverzeichnis

- [159] H Mertsching u. a. “Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation”. In: *Biomaterials* 26.33 (2005), S. 6610–6617.
- [160] D Papazian, PA Würtzen und SWK Hansen. “Polarized airway epithelial models for immunological co-culture studies”. In: *International archives of allergy and immunology* 170.1 (2016), S. 1–21.
- [161] CE Stewart u. a. “Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research”. In: *Journal of allergy* 2012 (2012).
- [162] S Jennings, H Ng und G Wang. “Establishment of a Δ F508-CF promyelocytic cell line for cystic fibrosis research and drug screening”. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 18.1 (2019), S. 44–53.
- [163] M Nakauchi u. a. “Propagation of Rhinovirus C in Differentiated Immortalized Human Airway HBEC3-KT Epithelial Cells”. In: *Viruses* 11.3 (2019), S. 216.
- [164] SM Kreda u. a. “Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells”. In: *The Journal of physiology* 584.1 (2007), S. 245–259.
- [165] BQ Shen u. a. “Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion”. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 266.5 (1994), S. L493–L501.
- [166] CI Grainger u. a. “Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier”. In: *Pharmaceutical research* 23.7 (2006), S. 1482–1490.
- [167] A Hidalgo, A Cruz und J Pérez-Gil. “Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery”. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 95 (2015), S. 117–127.
- [168] S Huang u. a. “Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAirTM) to assess respiratory sensitizers”. In: *Toxicology in Vitro* 27.3 (2013), S. 1151–1156.
- [169] E Bishop u. a. “An approach to testing and diluted e-cigarette aerosol in vitro using 3D reconstituted human airway epithelium”. In: *Toxicology in Vitro* 54 (2019), S. 391–401.
- [170] M Wirschell u. a. “Regulation of ciliary motility: conserved protein kinases and phosphatases are targeted and anchored in the ciliary axoneme”. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 510.2 (2011), S. 93–100.

Literaturverzeichnis

- [171] EK Vladar u. a. “Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia”. In: *Current Biology* 22.23 (2012), S. 2203–2212.
- [172] H Ong u. a. “Primary air–liquid interface culture of nasal epithelium for nasal drug delivery”. In: *Molecular pharmaceuticals* 13.7 (2016), S. 2242–2252.
- [173] L Liu u. a. “Method for quantitative study of airway functional microanatomy using micro-optical coherence tomography”. In: *PloS one* 8.1 (2013), e54473.
- [174] JA Yager, H Ellman und MJ Dulfano. “Human ciliary beat frequency at three levels of the tracheobronchial tree”. In: *American Review of Respiratory Disease* 121.4 (1980), S. 661–665.
- [175] J Rutland, WM Griffin und PJ Cole. “Human ciliary beat frequency in epithelium from intrathoracic and extrathoracic airways”. In: *American Review of Respiratory Disease* 125.1 (1982), S. 100–105.
- [176] P Paul Low u. a. “Ciliary beat frequency of human respiratory tract by different sampling techniques”. In: *American Review of Respiratory Disease* 130.3 (1984), S. 497–498.
- [177] C Clary-Meinesz u. a. “Ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles”. In: *Chest* 111.3 (1997), S. 692–697.
- [178] WM Boek u. a. “Physiologic and hypertonic saline solutions impair ciliary activity in vitro”. In: *The Laryngoscope* 109.3 (1999), S. 396–399.
- [179] M Boon u. a. “The influence of nebulized drugs on nasal ciliary activity”. In: *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 29.4 (2016), S. 378–385.
- [180] Y Min u. a. “Hypertonic saline decreases ciliary movement in human nasal epithelium in vitro”. In: *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* 124.3 (2001), S. 313–316.
- [181] MR Elkins und PTP Bye. “Mechanisms and applications of hypertonic saline”. In: *Journal of the Royal Society of Medicine* 104.1_suppl (2011), S. 2–5.
- [182] MH Levin u. a. “Hypertonic Saline Therapy in Cystic Fibrosis EVIDENCE AGAINST THE PROPOSED MECHANISM INVOLVING AQUAPORINS”. In: *Journal of Biological Chemistry* 281.35 (2006), S. 25803–25812.
- [183] D Pavia, ML Thomson und SW Clarke. “Enhanced clearance of secretions from the human lung after the administration of hypertonic saline aerosol”. In: *American Review of Respiratory Disease* 117.2 (1978), S. 199–203.

Literaturverzeichnis

- [184] WM Boek u. a. “Nasal mucociliary transport: new evidence for a key role of ciliary beat frequency”. In: *The Laryngoscope* 112.3 (2002), S. 570–573.
- [185] YT Bazargani u. a. “Essential medicines for COPD and asthma in low and middle-income countries”. In: *Thorax* 69.12 (2014), S. 1149–1151.
- [186] T Nakpheng u. a. “Evidences for salbutamol metabolism by respiratory and liver cell lines”. In: *Drug metabolism and pharmacokinetics* 32.2 (2017), S. 127–134.
- [187] G Di Benedetto, FS Manara-Shediak und A Mehta. “Effect of cyclic AMP on ciliary activity of human respiratory epithelium”. In: *European Respiratory Journal* 4.7 (1991), S. 789–795.
- [188] AB Lansley, MJ Sanderson und ER Dirksen. “Control of the beat cycle of respiratory tract cilia by Ca^{2+} and cAMP”. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 263.2 (1992), S. L232–L242.
- [189] A Yaghi, A Zaman und MB Dolovich. “The direct effect of hyperosmolar agents on ciliary beating of human bronchial epithelial cells”. In: *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 25.2 (2012), S. 88–95.
- [190] PR Sears, W Yin und LE Ostrowski. “Continuous mucociliary transport by primary human airway epithelial cells in vitro”. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 309.2 (2015), S. L99–L108.
- [191] H Matsui u. a. “Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces.” In: *The Journal of clinical investigation* 102.6 (1998), S. 1125–1131.
- [192] DJ Thornton, K Rousseau und MA McGuckin. “Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus”. In: *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008), S. 459–486.
- [193] C Ehre, C Ridley und DJ Thornton. “Cystic fibrosis: an inherited disease affecting mucin-producing organs”. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 52 (2014), S. 136–145.
- [194] M Chioccioli u. a. “Phenotyping ciliary dynamics and coordination in response to CFTR-modulators in Cystic Fibrosis respiratory epithelial cells”. In: *Nature communications* 10.1 (2019), S. 1763.
- [195] LL Clarke u. a. “Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in *Cftr* (-/-) mice.” In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.2 (1994), S. 479–483.

Literaturverzeichnis

- [196] N Hornef u. a. “DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects”. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 174.2 (2006), S. 120–126.
- [197] J Raidt u. a. “Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia”. In: *European Respiratory Journal* 44.6 (2014), S. 1579–1588.
- [198] M Kurkowiak, E Ziętkiewicz und M Witt. “Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics”. In: *Journal of medical genetics* 52.1 (2015), S. 1–9.
- [199] A Tarkar u. a. “DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility”. In: *Nature genetics* 45.9 (2013), S. 995.
- [200] MR Knowles u. a. “Mutations in SPAG1 cause primary ciliary dyskinesia associated with defective outer and inner dynein arms”. In: *The American Journal of Human Genetics* 93.4 (2013), S. 711–720.
- [201] MA Zariwala u. a. “ZMYND10 is mutated in primary ciliary dyskinesia and interacts with LRRC6”. In: *The American Journal of Human Genetics* 93.2 (2013), S. 336–345.
- [202] H Omran u. a. “Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins”. In: *Nature* 456.7222 (2008), S. 611.
- [203] NT Loges u. a. “Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects”. In: *The American Journal of Human Genetics* 85.6 (2009), S. 883–889.
- [204] C Austin-Tse u. a. “Zebrafish ciliopathy screen plus human mutational analysis identifies C21orf59 and CCDC65 defects as causing primary ciliary dyskinesia”. In: *The American Journal of Human Genetics* 93.4 (2013), S. 672–686.
- [205] IM Höben u. a. “Mutations in C11orf70 cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry due to defects of outer and inner dynein arms”. In: *The American Journal of Human Genetics* 102.5 (2018), S. 973–984.
- [206] HM Mitchison u. a. “Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia”. In: *Nature genetics* 44.4 (2012), S. 381.
- [207] A Horani u. a. “Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia”. In: *The American Journal of Human Genetics* 91.4 (2012), S. 685–693.

- [208] T Paff u. a. “Mutations in PIH1D3 cause X-linked primary ciliary dyskinesia with outer and inner dynein arm defects”. In: *The American Journal of Human Genetics* 100.1 (2017), S. 160–168.
- [209] A Merveille u. a. “CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs”. In: *Nature genetics* 43.1 (2011), S. 72.
- [210] S Blanchon u. a. “Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary ciliary dyskinesia”. In: *Journal of medical genetics* 49.6 (2012), S. 410–416.
- [211] I Ibañez-Tallon, S Gorokhova und N Heintz. “Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus”. In: *Human Molecular Genetics* 11.6 (2002), S. 715–721.
- [212] L Lee. “Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia”. In: *Journal of neuroscience research* 91.9 (2013), S. 1117–1132.
- [213] E Ahmed u. a. “Generation of the induced pluripotent stem cell line UHOMi001-A from a patient with mutations in CCDC40 gene causing Primary Ciliary Dyskinesia (PCD)”. In: *Stem cell research* 33 (2018), S. 15–19.
- [214] J Gala de Pablo u. a. “Biochemical fingerprint of colorectal cancer cell lines using label-free live single-cell Raman spectroscopy”. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 49.8 (2018), S. 1323–1332.
- [215] KJI Ember u. a. “Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review”. In: *NPJ Regenerative medicine* 2.1 (2017), S. 12.
- [216] M Steinke u. a. “Rapid Analysis of Cell–Nanoparticle Interactions using Single-Cell Raman Trapping Microscopy”. In: *Angewandte Chemie* 130.47 (2018), S. 15527–15527.
- [217] I Notingher u. a. “In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy”. In: *Journal of Spectroscopy* 16.2 (2002), S. 43–51.
- [218] A Taketani u. a. “Raman endoscopy for the in situ investigation of advancing colorectal tumors in live model mice”. In: *Analyst* 138.14 (2013), S. 4183–4190.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei **Dr. Maria Steinke** bedanken. Danke, dass du es mir ermöglicht hast, direkt nach meiner Masterarbeit in deiner Arbeitsgruppe mit meiner Dissertation durchzustarten und somit dazu beigetragen hast, dass ich jetzt dort stehe, wo ich stehe. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass du immer für mich erreichbar warst, obwohl der kleine Philipp auf die Welt kam.

Ein großer Dank geht an **Prof. Dr. Roy Gross**, der große Flexibilität zeigte und relativ kurzfristig als mein Betreuer einsprang und der Übernahme des zweiten Gutachtens zustimmte.

Ebenfalls möchte ich **Prof. Dr. Helge Hebestreit** nicht nur für die Bereitstellung des Themas danken, sondern für seine Hilfestellungen, die mir einen klinischen Blickwinkel ermöglichten. Natürlich möchte ich mich ebenso bei **PD Dr. Stephan Hackenberg** bedanken. Der Dank gilt nicht nur der regelmäßigen Versorgung mit Nasenschleimhautbiopsaten, sondern auch den guten Ratschlägen während unserer regelmäßigen Meetings.

Danke, **Prof. Dr. Heike Walles** für die anfängliche Betreuung und natürlich für die Ermöglichung meiner Promotion am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin.

Darüber hinaus danke ich dem Prüfungsvorsitz.

Danke, **Dr. Florian Segerer**, für die tolle Organisation der PCD-Patientenproben. Diese Arbeit wurde von dem **interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF)** finanziell unterstützt, dafür ein großes Dankeschön.

Danke an **Prof. Dr. Thorsten Walles**, der in Würzburg und später in Magdeburg die tracheobronchialen Biopsate, die zum Aufbau der Modelle verwendet wurden, zur Verfügung stellte. Außerdem vielen Dank an **Prof. Dr. Gudmundur Hrafn Gudmundsson** und **Dr. Tobias May** für die Bereitstellung der Zelllinie VA10 bzw. Cl-huAEC.

Ich bedanke mich sehr bei **Alexander Perniss** aus Gießen, dass er sich so viel Zeit genommen hat und mir mit der Etablierung der HGK an unserem Lehrstuhl geholfen hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei **Prof. Dr. Anja Ehrhardt** aus Witten und im Speziellen bei **Dr. Eric Ehrke-Schulz** bedanken, dass ich die Möglichkeit bekam, eine zweiwöchige Einführung in das CRISPR/Cas9 System zu erhalten. Auch bei **Prof. Dr. Heymut Omran** aus Münster, seiner Arbeitsgruppe und im Besonderen bei **Sandra Cindric** möchte ich mich für das Erlernen der Zellisolation aus nasalen Schleimhautabstrichen bedanken und bei **Dr. Niki Tomas Loges** für die guten Gespräche vor Ort und dem Mutmachen vor meinem ersten Vortrag auf der 40. GPP in Wien.

Besonderer Dank gilt hier **Prof. Dr. Krohne** bzw. **Prof. Dr. Stigloher** sowie **Daniela Bunsen** und **Claudia Gehrig** für die kompetente Hilfe bei der TEM- und REM-Analyse und die Zeit, die sie sich dafür genommen haben.

Außerdem möchte ich mich bei **Dr. Sarah Nietzer** bedanken, dass sie sich die Zeit genommen hat, mich in die unendlichen Tiefen der Statistik einzuführen.

Natürlich möchte ich dem gesamten **Team des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin** zunächst für die Ausführung der Schweine-OPs, vor allem aber für die gute Arbeitsatmosphäre, der ehemaligen Besetzung des Doktorandenbüros im ersten Stock für die wissenschaftlichen- und eher unwissenschaftlichen Gespräche und der gesamten **extended version der Atemwegs-/Knorpelgruppe** für den wissenschaftlichen Austausch (nicht nur über *B. pertussis* und BMP) danken.

Danke liebe **Lisa Kiesewetter**, dass wir uns immer über den aktuellen Stand unserer Paper und Dr. Arbeiten austauschen konnten und uns gegenseitig Mut zugesprochen haben. Aber vor allem bin ich dir UNENDLICH dankbar für die vielen LaTeX-Ratschläge. Ohne dich würde meine Arbeit anders aussehen...

Vielen Dank an **Christoph, Sebastian K.** und **Sebastian S.**, dass ihr mir immer mit Ratschlägen zur Seite standet (weil ihr so schon so alt und wise seid) und mir nicht nur die Mittagspausen versüßt habt (im wahrsten Sinne des Wortes).

Ganz besonders danke ich **Heike Oberwinkler**, der besten Arbeitskollegin und inzwischen Freundin, die ich mir während der gesamten Zeit hätte vorstellen können. Danke für deine Hilfe, die Medienwechsel und natürlich für die unzähligen tollen und tiefgründigen Gespräche.

Danke liebe **Miri**, nicht nur fürs Probelesen, sondern auch für die Motivations-Snack-Box und, dass dein Gesicht die letzten 3 1/2 Jahre meinen Arbeitsplatz aufgehübscht hat. Danke **Vanessa**, dass du dir die letzten Jahre nicht nur meine Erfolge, sondern auch meine Tiefschläge während der turbulenten Zeit angehört hast und immer für mich da bist. Danke, dass du deine Zeit ins Lesen meiner Arbeit investiert hast. Du bist die beste Freundin, die ich mir wünschen könnte.

Ich möchte von ganzem ♥ meiner **Familie** danken, die mich immer unterstützt und ermutigt! Danke an die weltbesten **Eltern**, die mir überhaupt erstmal alles ermöglichten. Danke Mama und Papa, dass ich mich schon immer auf euch verlassen konnte! Und natürlich geht auch ein riesen Dankeschön an **Matze und Melissa**. Nicht nur dafür, dass ihr eure knappe Zeit ins Lesen meiner Diss investiert habt, sondern auch dafür, dass ihr immer an mich glaubt.

Und natürlich: Danke **Sascha**, dass du jeden Tag an mich glaubst und mich größer machst, als ich es selbst je tun werde. Um Fynn Kliemann zu zitieren: Ganz egal wo wir landen; Mein Zuhause ist kein Ort; Das bist du.

Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Tissue Engineering für seltene Erkrankungen mit Störungen des mukoziliären Transporteigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "*Tissue engineering for rare diseases with impaired mucociliary transport*" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

.....
Place, Date

.....
Signature

Publikationen

- Manuskript akzeptiert: **Nina Lodes**, Katharina Seidensticker, Alexander Perniss, Sarah Nietzer, Heike Oberwinkler, Tobias May, Thorsten Walles, Helge Hebestreit, Stephan Hackenberg, Maria Steinke, „Investigation on ciliary functionality of different airway epithelial cell lines in 3D cell culture“, Tissue Engineering Part A. (2019)
- Matthias Schweinlin, Angela Rossi, **Nina Lodes**, Christian Lotz, Stephan Hackenberg, Maria Steinke, Heike Walles, Florian Groeber, „Human barriermodels for the in vitro assessment of drug delivery“, Drug Deliv. and Transl. Res. (2017) 7:217–227

Anhang

1. Materialien

- Glaspipetten, sterile Einwegpipetten
- 1000 µl Pipette, sterile Pipettenspitzen
- Zellkulturflasche, 25 oder 75 cm², cellcoat®, Collagen type 1, (Greiner bioone, Art. No. 658950)

2. Geräte

- Sterilwerkbank
- Inkubator (37°C, 5 % CO₂)
- Absaugpumpe
- Pipet boy
- Wasserbad (37°C)
- Zentrifuge

3. Chemikalien und Lösungen

- Zellspezifisches Medium (AECG)
- Anti-Anti (10x)

4. Durchführung

- Bürste in Transportfalcon ausschütteln
- 1. Zentrifugationsschritt mit Bürste im Falcon (1200 rpm, 5 min, RT)
- Bürste erneut im Falcon ausschütteln und entfernen
- 2. Zentrifugationsschritt ohne Bürste im Falcon (1200 rpm, 5 min, RT)
- Überstand absaugen und „Zellpellet“ in passendem Volumen (1- 2 ml) des spezifischen Zellkulturmediums resuspendieren
- Zellsuspension in kollagen-beschichtete Zellkulturflaschen überführen

5. Anmerkungen

- Zellen benötigen einige Zeit um zu adhären
- Kein Medienwechsel nach 24 h
- Erster Medienwechsel findet nach 3 - 4 Tagen statt, möglicherweise vorher etwas frisches Medium zugeben
- Zelladhäsion unter dem Mikroskop kontrollieren

1. Materialien

- sterile Einwegpipetten
- sterile Pipettenspitzen
- sterile Pinzetten (Präparierbesteck)
- Delta T-Dishes (beschichtet mit Sylgard Polymer (Sylgard 184, DOWSIL Bestellnr. 101697))
- 6 well-Platte
- Insektennadeln

2. Geräte

- Hochgeschwindigkeitsmikroskop (inkl. Kamera und PC Anschluss)
- Biotech Delta T-Dish System

3. Chemikalien und Lösungen

- Zellspezifisches Medium (AECG)
- Dynabeads (Invitrogen™, Dynabeads™ Protein G, Katalognr. 10003D)

4. Durchführung

4.1 Vorbereitung der Modelle

- Beschichtung der Delta T-Dishes mit Sylgard (Zwei Komponentensystem - ca. 2 ml/Schälchen - luftblasenfrei)
- Nach einer Mindestkulturdauer von 21 Tagen wird mit Hilfe des Luftobjektivs auf das Vorhandensein motiler Kinozilien geprüft
- Modelle werden mindestens 1x apikal mit Medium gewaschen, Mukus wird abgesaugt

4.2 Vorbereitung des Setups

- 2 Stecker in Steckdose
- Plug In Schalter an Mehrfachsteckdose anschalten
- Mikroskop anschalten, Biotech Temperatursystem einschalten (Normalerweise ist passende Temperatur bereits voreingestellt)
- PC hochfahren
- Motion Traveller starten

4.3 Videoaufnahme

- Aufspannen der Modelle in Delta T-Dish mit Hilfe von Insektennadeln
- Einlegen der Delta T-Dish in passenden Rahmen unter dem Mikroskop
- Überschichten des Modells mit 2 ml zellspezifischem Medium
- Hardware Einstellungen/Objektiv:
 - Ziliäre Schlagfrequenz (CBF): 10 Sekunden, 1000 Bilder, Aufnahmezeit: 100 Bilder/s // 40 x
 - Partikeltransportstudien (PTS): 15 Sekunden, 3000 Bilder, Aufnahmezeit: 200 Bilder/s // 20x
Konzentration Dynabeads: 2 µl beads auf 2 ml Medium
- Zur Videoaufnahme: Motion Traveller

